

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**Análisis Molecular de la Sinaptogénesis  
Dependiente de PI3K en *Drosophila*.**

Sheila M<sup>a</sup> Jordán Álvarez  
Madrid, Noviembre 2012







FACULTAD DE  
CIENCIAS

**Universidad Autónoma de Madrid**  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# **Análisis Molecular de la Sinaptogénesis Dependiente de PI3K en *Drosophila*.**

Memoria que presenta, para optar al  
grado de Doctor, la licenciada en  
Bioquímica y Biología **Sheila M<sup>a</sup>  
Jordán Álvarez**.

Director: **Ángel Acebes Vindel**  
Doctor Contratado del CSIC

Director: **Alberto Ferrús Gamero**  
Profesor de Investigación del CSIC

Madrid, Noviembre 2012



Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión a Sheila M<sup>a</sup> Jordán Álvarez de una Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación #BES-2007-16597 y a los proyectos de investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación #BFU2006-10180 y #BFU2009-12410.



Para mi “familia”.



En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis, Ángel y Alberto, su confianza, apoyo y orientación durante estos años. Sin su ayuda esta Tesis no habría sido posible.

También quiero dar las gracias a mis antiguos y actuales compañeros de laboratorio: Jesús, Ben, Álex, Bea, Alfonso, Clemen, Rodri, Citlali, Jaime, Valèrie, Alicia, Sergio, Merce y M<sup>a</sup> Carmen. Gracias Jesús por enseñarme como se hacen clonajes, WB y a disecar las larvitas. Gracias Alicia por explicarme y enseñarme las QPCR. Muchas gracias M<sup>a</sup> Carmen por ayudarme con la mutagénesis. Muchas gracias a Balta por presentarme a Ángel y a Ángel por enseñarme aquel verano los principios básicos de *Drosophila* y los test de comportamiento larvario y adulto. Además, quiero dar las gracias a los diversos estudiantes de proyecto fin de carrera, máster y verano que han pasado por el laboratorio a lo largo de estos años.

Gracias a José Luis, Belén y Carmen por su ayuda con el microscopio confocal. También, gracias a Silvia por ayudarme a usar los equipos del SBMC y al resto del personal de administración y otros servicios del Instituto Cajal por la ayuda prestada estos años.

Por otro lado, quisiera agradecer a todos los miembros del laboratorio de Dr. Stephan Sigrist su ayuda y colaboración el tiempo que estuve allí, especialmente a Wernher, Sara, Harald y Christine.

A mis amigos, sobretodo a Ruth, Marina, Germán, María y Yube, por preguntarme siempre como iban mis "bichos" aunque no entiendan del todo lo que hago.

Muchas gracias a toda mi familia por el apoyo que me han prestado estos años y por el orgullo que sienten incluso los que ya no están Juan, Tino y Miguel.

Gracias Papá y Mamá por todos los sacrificios que habéis hecho desde que nací para que pudiera estudiar, incluyendo dejar al resto de la familia atrás. Gracias "hermanito" por estar siempre a mi lado mientras estudiaba o trabajaba en el ordenador.

Por último, muchas gracias Cristian, por tu apoyo y amor durante estos 12 años. Sin ti no habría sido posible.





## ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>17</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>23</b>
<b>RESUMEN/SUMMARY</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>33</b>
1. <i>DROSOPHILA</i> COMO ORGANISMO EXPERIMENTAL.....	35
2. LAS SINAPSIS.....	36
2.1. Sinapsis eléctricas.	36
2.2. Sinapsis químicas.	37
2.2.1. Zona activa en el compartimento presináptico.	38
2.2.1.1. UNC3/Munc13.	38
2.2.1.2. RIMs.	38
2.2.1.3. ELKS.	38
2.2.1.4. Bassoon y Piccolo.	39
2.2.1. 5. Liprin $\alpha$ .	39
2.2.2. Hendidura sináptica.	39
2.2.3. Compartimento postsináptico.	40
3. FOSFOINOSÍTIDO 3 – QUINASA (PI3K) Y OTRAS QUINASAS.....	42
3.1. FOSFOINOSITIDOS.	42
3.2. CLASES DE PI3K.	43
3.2.1. Clase I de PI3K.	43
3.2.1.1. Clase IA de PI3K.	44
3.2.1.2. Clase IB de PI3K.	44
3.2.2. Clase II de PI3K.	44
3.2.3. Clase III de PI3K.	45
3.3. ESTRUCTURA DE PI3K.....	46
3.3.1. Dominio catalítico.	46
3.3.2. Dominio de unión a Ras.	46
3.4. DIANAS DE PI3K: LA PROTEÍNA AKT.....	46
3.5. GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK3).....	47
3.6. FUNCIONES DE PI3K.....	48

3.6.1. Formación de sinapsis.	48
3.6.2. Conservación de la vía sinaptogénica en vertebrados.	49
3.6.3. PI3K y la inserción de receptores en la membrana.	49
3.6.4. PI3K y ciclo vesicular.	49
3.6.5. PI3K en memoria espacial.	50
3.6.6. PI3K en plasticidad sináptica.	50
4. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA EN EL ESTUDIO DE LA SINAPTOGÉNESIS.....	51
<b>OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
1. ESTIRPES DE <i>DROSOPHILA</i> .....	61
2. SISTEMA UAS/GAL4.....	63
3. MUTAGÉNESIS CON EMS.....	64
4. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	65
4.1. Número de sinapsis.	65
4.2. Número de densidades postsinápticas (PSDs).	65
5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA (WESTERN BLOT).....	66
6. PCR CUANTITATIVA.....	67
7. FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTOBLEACHING.....	69
8. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	70
9. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	71
10. ESTADÍSTICA.....	71
<b>RESULTADOS</b>	<b>73</b>
1. BÚSQUEDA DE GENES QUE INTERACTÚAN CON PI3K O GSK3.....	75
2. CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA SINAPTOGÉNICA.....	77
2.1. PI3K, AKT Y GSK3 FORMAN PARTE DE UNA MISMA RUTA.	
2.1.1. PI3K activa a AKT.	77
2.1.2. Relación entre PI3K y GSK3 en la sinaptogénesis.	78

2.1.3. Relación entre AKT y GSK3.	81
2.2. RECEPTORES DE LA VÍA.	85
2.2.1. Papel de Wit y Gbb en la sinaptogénesis.	85
2.2.2. Receptores postinápticos (Htl y Btl) y sus ligandos.	89
2.2.3. Otros receptores probados y no relacionados con la sinaptogénesis.	94
2.3. MAPK Y OTRAS PROTEÍNAS POR DEBAJO DE PI3K EN LA VÍA SINAPTOGÉNICA.	96
2.3.1. Ras	96
2.3.2. Hiw y combinaciones con PI3K	99
2.3.3. Vía de las MAPK (JNK)	101
2.4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.	105
2.4.1. Jun y Fos.	105
2.4.2. Mad y Medea.	107
3. EFECTO DE PI3K EN LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO Y OTRAS PROTEÍNAS POSTSINÁPTICAS.....	111
3.1. PI3K CONTROLA EL NÚMERO DE PSDS EN LA NMJ.	111
3.2. PI3K VARÍA LA EXPRESIÓN DE GLURIIA.	112
3.3. PI3K MODIFICA LA EXPRESIÓN DE DLG.	116
3.4. LA INCORPORACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE GLURII EN LAS PSDS ES INDEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE PI3K.	119
3.5. LA EXPRESIÓN POSTSINÁPTICA DE PI3K NO MODIFICA EL NÚMERO DE SINAPSIS NI EL DE PSDS.	121
4. CONTROL TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE PI3K.....	123
4.1. LA ACTIVACIÓN NEURONAL DE PI3K ES NECESARIA Y SUFICIENTE PARA LA SINAPTOGÉNESIS.	123
4.2. LA EXPRESIÓN NEURONAL DE PI3K ES NECESARIA Y SUFICIENTE PARA INCREMENTAR LAS PSDS DEL LADO POSTSINÁPTICO.	126
5. POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE PI3K.....	126
5.1. EFECTOS DE PI3K EN LA TRANSCRIPCIÓN DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS.	126
5.2. LA UBIQUITINACIÓN.	128

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>131</b>
1. ANÁLISIS DE LA VÍA SINAPTOGÉNICA DEPENDIENTE DE PI3K.....	133
1.1. RELACIÓN DE PI3K, AKT Y GSK3 EN LA SINAPTOGÉNESIS.	133
1.2. EL RECEPTOR (WIT) Y EL LIGANDO (GBB).	135
1.3. LOS RECEPTORES POSTSINÁPTICOS (HTL Y BTL).	135
1.4. PROTEÍNAS POR DEBAJO DE PI3K EN LA VÍA SINAPTOGÉNICA.	137
1.5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.	139
1.5.1. Jun y Fos.	139
1.5.2. Mad y Medea.	139
1.6. CANDIDATOS NO SINAPTOGÉNICOS.	140
2. EFECTO DE PI3K EN LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO Y OTRAS PROTEÍNAS POSTSINÁPTICAS.....	141
3. POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE PI3K.....	143
3.1. LA TRANSCRIPCIÓN.	143
3.2. LA UBIQUITINACIÓN.	143
4. CONTROL TEMPORAL DE LAS SINAPSIS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	144
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS</b>	<b>171</b>
<i>Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of Drosophila.....</i>	173

## **ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS**





## **INTRODUCCIÓN** **33**

Figura I1. Ciclo de vida de <i>Drosophila</i> .....	35
Figura I2. Sinapsis eléctrica.....	36
Figura I3. Estructura de una sinapsis química.....	37
Tabla I1. Principales proteínas localizadas en la PSD glutamatérgica.....	41
Figura I4. Estructura de los fosfoinosítidos.....	42
Figura I5. Reacciones catalizadas por las PI quinasas.....	43
Figura I6. Clases de PI3K.....	45
Figura I7. Sistema neuromuscular larvario.....	51
Figura I8. Ensamblaje de las sinapsis <i>in vivo</i> .....	53

## **MATERIALES Y MÉTODOS** **59**

Figura M1. Sistema UAS/Gal4.....	64
Tabla M1. Secuencias de hibridación de las sondas de QPCR.....	69

## **RESULTADOS** **73**

Tabla R1. Análisis de la letalidad de PI3K y GSK3.....	75
Figura R1. Cantidad de relativa de AKT – P/AKT en larvas que sobreexpresan PI3K o que expresan un dominante negativo de esa quinasa (PI3K <sup>DN</sup> ).....	78
Figura R2. El dominante negativo de GSK3 (GSK3 <sup>DN</sup> ) no tiene efecto en la formación de sinapsis.....	80
Figura R3. Cantidad de relativa de las isoformas de GSK3 en diferentes genotipos.....	81
Figura R4. Número de sinapsis en larvas que expresan PI3K, GSK3 o combinaciones de ambas.....	82
Figura R5. Número de sinapsis en larvas expresando AKT, GSK3 o combinaciones de ambas.....	84
Figura R6. Cantidad de relativa de AKT – P/AKT en diferentes genotipos.....	85
Figura R7. La sobreexpresión de Wit aumenta el número de sinapsis.....	87
Figura R8. Efecto de los mutantes de Wit en el número de sinapsis.....	88
Figura R9. La sobreexpresión de Gbb en el músculo aumenta el número de sinapsis.....	90
Figura R10. Efecto de los mutantes de Gbb en la sinaptogénesis.....	91
Figura R11. Efecto de los mutantes de Htl y Btl en la sinaptogénesis.....	92

Figura R12. Localización de Htl y Dof.....	93
Figura R13. Efecto en la transcripción de Gbb en diferentes genotipos.....	94
Figura R14. PCRs cuantitativas de Pyr, Ths y Bnl.....	95
Figura R15. Receptores no implicados en la sinaptogénesis.....	96
Figura R16. La sobreexpresión de Ras da lugar a nuevas sinapsis.....	97
Figura R17. Ras interacciona con PI3K en la sinaptogénesis.....	98
Figura R18. PI3K no necesita la activación de Ras para inducir sinaptogénesis.....	99
Figura R19. Hiw está implicado en la sinaptogénesis.....	100
Figura R20. Hiw es necesario para la sinaptogénesis dependiente de PI3K.....	101
Figura R21. Efecto de Wnd y Hep en la formación de nuevas sinapsis.....	103
Figura R22. Bsk aumenta el número de sinapsis.....	104
Figura R23. Bsk necesita la activación de Ras para formar nuevas sinapsis.....	104
Figura R24. La sobreexpresión de Jun induce la formación de nuevas sinapsis.....	106
Figura R25. Fos interviene en la sinaptogénesis.....	106
Figura R26. Jun y Fos cooperan en la formación de nuevas sinapsis.....	107
Figura R27. Medea tiene un papel antisinaptogénico.....	108
Figura R28. Mad también tiene un papel antisinaptogénico.....	109
Tabla R2. Proteínas de la vía sinaptogénica dependiente de PI3K y su efecto en las sinapsis.....	110
Tabla R3. Número de sinapsis y densidades postsinápticas.....	112
Tabla R4. Tamaño de las densidades postsinápticas.....	112
Tabla R5. Número de botones y su tamaño medio.....	112
Figura R29. Efecto de la sobreexpresión presináptica de PI3K en los GluRII.....	113
Figura R30. La expresión presináptica de PI3KDN afecta a los GluRII.....	114
Figura R31. La regulación de los niveles de GluRIIA es dependiente de PI3K.....	115
Figura R32. Regulación de los niveles de GluRIIA dependiente de PI3K en el SNC.....	116
Figura R33. Efecto de PI3K en los niveles de las isoformas deDlg.....	117
Figura R34. Efecto de PI3K en los niveles deDlg en SNC.....	118

Figura R35. Papel de PI3K en la dinámica de GluRIIA.....	120
Tabla R6. Número total de botones y porcentaje de botones satélite respecto del total.....	121
Figura R36. La expresión de PI3K en la región postsináptica no afecta el número de sinapsis o PSDs.....	122
Figura R37. La activación de PI3K en larva modifica el número de sinapsis.....	124
Figura R38. La activación temporal de PI3K <sup>DN</sup> disminuye el número de sinapsis y PSDs.....	125
Figura R39. La activación temporal de PI3K aumenta el número de PSDs.....	127
Figura R40. PI3K no afecta a la transcripción de genes sinápticos.....	129
Figura R41. La formación de nuevas sinapsis necesita el dominio de ubiquitinación de Hiw.....	130

## **DISCUSIÓN** **131**

Figura D1. Esquema simplificado de la vía sinaptogénica dependiente de PI3K.....	141
-------------------------------------------------------------------------------------	-----



## **ABREVIATURAS**



aa: Aminoácidos

AMPA: Ácido  $\alpha$  – amino – 3 – hidroxí – 5 – metil – 4 – isoxazoleproico ( *$\alpha$ -mino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*).

AP- 1: Proteína activadora 1 (*Activator protein 1*).

ATP: Adenosin trifosfato (*Adenosine TriPhosphate*).

AZ: Zona activa (*Active zone*)

BMP: Proteína morfogenética ósea (*Bone morphogenetic protein*).

Brp: Bruchpilot.

Bsk: Basket.

Bnl: Branchless.

Btl: Breathless.

CAZ: Citomatriz de la AZ (*Cytomatrix at the Active Zone*).

Dlg: Discs Large.

Dpp: Decapentaplegic.

D-Syd1: Sinapsis defectuosa 1 en *Drosophila* (*Drosophila Synapse Defective*)

Faf: Fat Facets

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*).

FRAP: Recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo.

GABA: Ácido  $\gamma$  – aminobutírico ( *$\gamma$ -Aminobutyric acid*).

Gbb: Glass bottom boat.

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*).

GluRII: Receptores de glutamato de tipo II (*Glutamate Receptor type II*).

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3.

Hep: Hemipterous.

Hiw: Highwire.

Htl: Heartless.

HRP: Peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*).

JNK: Quinasa c – Jun N – terminal (*c-Jun N-terminal kinases*).

LAR: Antígeno relacionado con leucocitos (*Leucocyte Antigen Related*).

LIII: Larva de tercer estadio.

Mad: Mother against Dpp.

MAGUK: Quinasas guaniladas asociadas a membrana (*membrane-associated guanylate kinase*).

MAP1B: Proteína asociada a microtúbulos 1B (*Microtubule-associated protein 1B*).

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinase*).

MAPKK: Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno (*MAPK kinase*).

MAPKKK: Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno (*MAPKK kinase*).

MuSK: Quinasa específica de músculo (*Muscle – Specific Kinase*).

NGF: Factor de crecimiento nervioso (*Nerve growth factor*).

NMDA: N – metil – D – aspártico (*N– methyl– D– aspartate*).

NMJ: Unión neuromuscular (*Neuromuscular junction*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PH: Homólogo de Pleckstrina (*Pleckstrin homology*).

PI: Fosfoinosítidos (*Phosphoinositides*).

PI3K: Fosfoinosítido 3– quinasa (*Phosphoinosite 3– kinase*).

PSD: Densidades postsinápticas (*Postsynaptic densities*).

PtdIns: Fosfatidilinositol (*Phosphatidylinositol*).

PTEN: Homólogo de tensina y fosfatasa (*Phosphatase and tensin homolog*).

Pyr: Pyramus.

QPCR: PCR cuantitativa (*Quantitative PCR*).

RFP: Proteína roja fluorescente (*Red Fluorescent Protein*).

Rheb: Homólogo de Ras enriquecido en cerebro (*Ras homolog enriched in brain*).

RT – PCR: PCR inversa (*Reverse transcription PCR*).

Syb: Sinaptobrevina (*Synaptobrevin*).

SNC: Sistema Nervioso Central.

TGF–  $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*Transforming growth factor beta*).

Ths: Thisbe.

TOR: Diana de la rapamicina (*Target of Rapamycin*).

UAS: Upstream Activation Sequence.

WB: Western Blot.

Wg: Wingless.

Wit: Wishful Thinking.

Wnd: Wallenda.



**Convenios de nomenclatura**

↑: Sobreexpresión o hiperexpresión mediante el uso de UAS.

↓: Hipoeexpresión mediante el empleo de dominantes negativos (DN), ARN de interferencia (ARNi) o mutantes.

*Upstream*: Este término se ha traducido como “por encima”.

*Downstream*: Este término se ha traducido como “por debajo”.



## **RESUMEN/SUMMARY**



La fosfoinositol 3 – quinasa (PI3K) está implicada en diferentes vías que, si son alteradas, pueden dar lugar a enfermedades como el cáncer, la diabetes o el Alzheimer. Datos previos han mostrado que, tanto en *Drosophila* como en mamíferos, la regulación cuantitativa de PI3K/AKT/GSK3 en neuronas controla la sinaptogénesis. Las nuevas sinapsis son funcionales e inducen cambios en el comportamiento.

Nuestro objetivo principal es identificar qué otras proteínas efectoras o dianas forman parte de esta vía sinaptogénica utilizando como modelo experimental la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila*. Además, queremos resolver también si el efecto sinaptogénico de PI3K es autónomo celular.

Nuestros resultados muestran que proteínas de la vía de JNK, Ras, el receptor *Wishful thinking* con su ligando *Glass bottom boat*, la E3 ubiquitina ligasa *Highwire*, así como los factores de transcripción Jun – Fos y Mad – Medea están implicados en la misma vía de señalización sinaptogénica. Además, hemos analizado las consecuencias sobre la parte postsináptica de dirigir específicamente la expresión de PI3K en la zona presináptica. Los datos demuestran que PI3K controla la formación de sinapsis desde el lado presináptico, regulando el número de receptores de glutamato y otras proteínas de la parte postsináptica sin alterar la dinámica de formación de esos receptores. Hemos demostrado también que el tiempo de formación de sinapsis es de 20 – 30 horas.

En resumen, hemos revelado nuevos elementos de la vía sinaptogénica dependiente de PI3K y hemos determinado el papel autónomo de la señalización de PI3K desde el lado presináptico.

The phosphoinositide 3 kinase (PI3K) is involved in several pathways which, if defectives, can lead to diseases like cancer, diabetes or Alzheimer. Previous data have shown that, in *Drosophila* and mammals, the quantitative regulation of PI3K/AKT/GSK3 in neurons control synaptogenesis. The new synapses are functional and elicit changes in the behaviour.

The aim of this study is to identify other elements involved in this signalling pathway using the neuromuscular junction of *Drosophila* as experimental system. Also, we have questioned the cell autonomy of the synaptogenic effect due to PI3K.

Our results show that additional kinases from JNK pathway, Ras, the receptor *Wishful thinking*, its ligand *Glass bottom boat*, the E3 ubiquitin ligase Highwire and the transcription factors Jun – Fos and Mad – Medea are implicated in the same synaptogenic pathway. In addition, we analysed the effects in the postsynaptic side caused by the presynaptic PI3K expression. The data show that the number of synapses and postsynaptic densities is increased when PI3K is expressed in the presynaptic but not in the postsynaptic side. Moreover, the dynamics of GluR assembly remained normal. The average time for synaptogenesis is around 20-30 h.

In summary, we have unveiled additional elements of the synaptogenic signalling pathway and determined the autonomous role of the presynaptic side, at least, in the signalling due to PI3K.

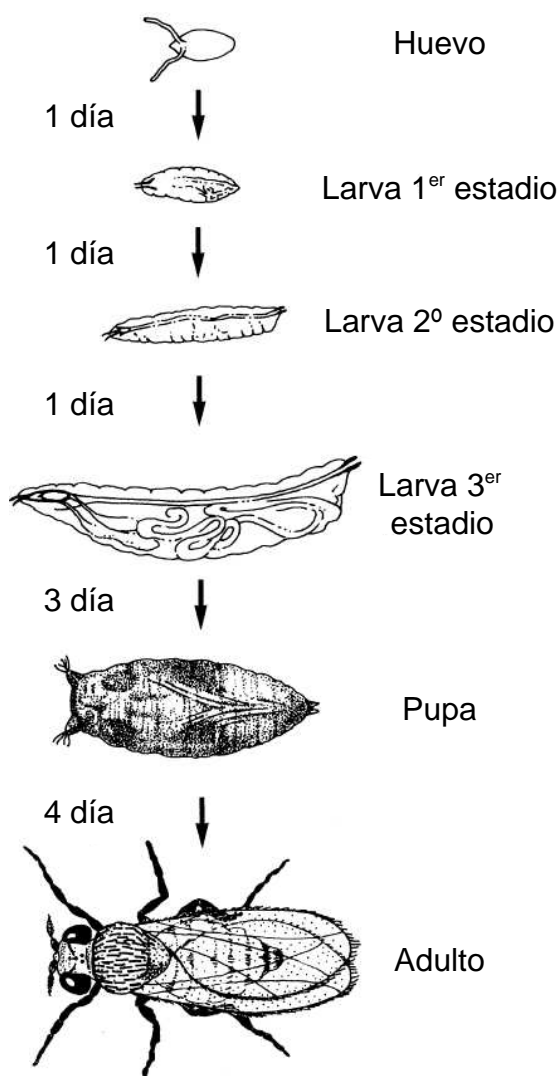
# INTRODUCCIÓN





## 1. *DROSOPHILA* COMO ORGANISMO EXPERIMENTAL.

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo (que realiza metamorfosis completa) con un tiempo de generación muy corto, 10 – 12 días a 25°C (**Fig. II**), y una progenie elevada. Su ciclo de vida tiene diferentes etapas: embriogénesis, periodo larvario, pupa y mosca adulta (Revisado en Rubin, 1988). Es un organismo comúnmente usado para estudios de genética, biología del desarrollo, biología molecular, electrofisiología y comportamiento entre otros. Además, muchos de sus genes están conservados en vertebrados (Revisado Rubin et al., 2000) por lo que puede ser empleada como modelo de enfermedades humanas (Revisado en Bilen y Bonini, 2005).



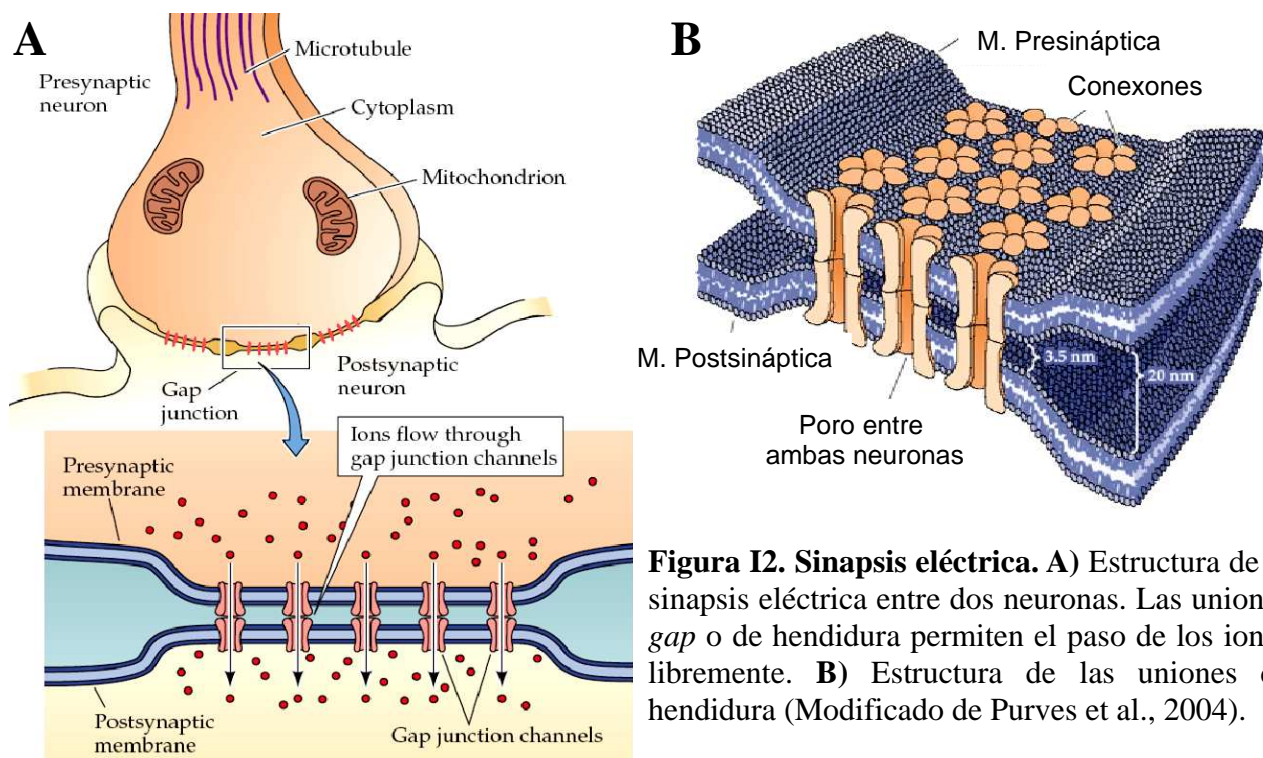
**Figura II. Ciclo de vida de *Drosophila*.** El ciclo dura aproximadamente 10 – 12 días a 25° C. Se compone de una fase larvaria que dura aprox. 5 días y una fase adulta después de la metamorfosis. Las moscas adultas pueden vivir hasta 60 días en el laboratorio (Modificado de Rubin, 1988).

## 2. LAS SINAPSIS.

Las sinapsis son estructuras dinámicas que median la comunicación entre neuronas o bien entre neuronas y sus tejidos diana. Fue Charles Sherrington (1897) quien acuñó el término sinapsis para referirse al lugar especializado en el contacto y comunicación entre dos neuronas. Existen dos tipos de sinapsis: eléctricas y químicas.

### 2.1. Sinapsis eléctricas.

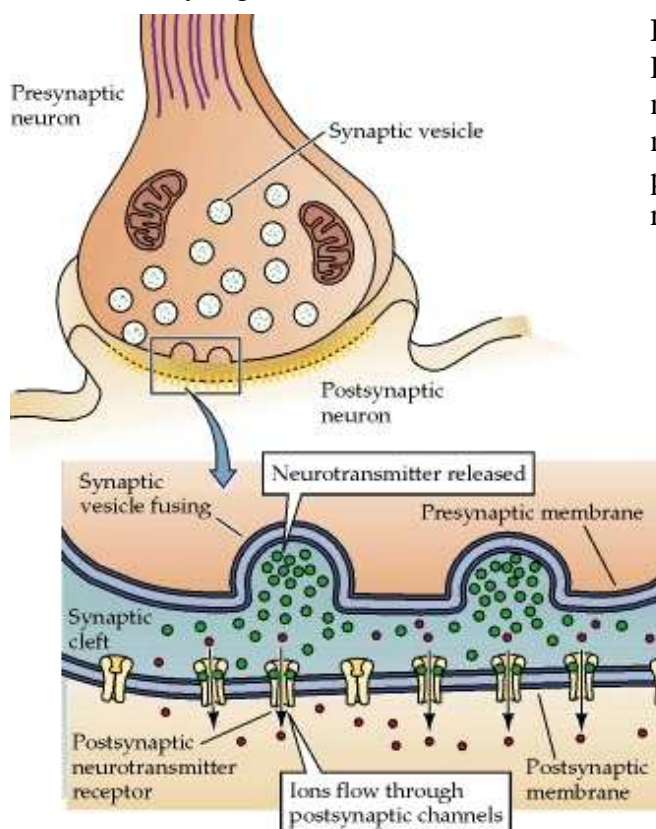
Las sinapsis eléctricas permiten el paso de la información en forma de señal eléctrica de forma directa y pasiva entre las neuronas. Estas sinapsis son bidireccionales y el tránsito solo está limitado por el peso molecular de los productos circulantes (Purves, 2004). Las membranas de ambas neuronas están unidas por uniones de tipo *gap* o hendidura (**Fig. I2A**). Estas uniones están constituidas por dos hemicanales (conexones), incluidos en las dos membranas plasmáticas, que a su vez están formados por 6 oligómeros llamados conexinas. Estos hemicanales forman poros a través de los cuales pueden pasar iones transmitiendo el voltaje de una célula a otra. (**Fig. I2B**; Purves et al., 2004).



**Figura I2. Sinapsis eléctrica.** **A)** Estructura de la sinapsis eléctrica entre dos neuronas. Las uniones *gap* o de hendidura permiten el paso de los iones libremente. **B)** Estructura de las uniones de hendidura (Modificado de Purves et al., 2004).

## 2.2. Sinapsis químicas.

Las sinapsis químicas utilizan como neurotransmisor agentes químicos (glutamato, acetilcolina, GABA, glicina, etc.). La estructura de estas sinapsis se compone de un elemento presináptico, otro postsináptico (otra neurona, un músculo o un órgano) y el espacio, llamado hendidura sináptica, entre ambas células (**Fig. I3**). Entre los orgánulos celulares típicos de las sinapsis químicas figuran las vesículas presinápticas (Revisado en Sudhof, 2004) en cuyo interior se localizan los neurotransmisores que causan efectos inhibitorios como el ácido gamma amino-butírico (GABA) o excitatorios como la acetilcolina y el glutamato (**Fig. I3**). Estas moléculas actúan como mensajeros químicos que se liberan en la hendidura sináptica (Purves et al, 2004), activan su correspondiente receptor postsináptico, producen despolarización o hiperpolarización (según el tipo de neurotransmisor y receptores existentes) de la membrana y modulan una serie de cascadas de señalización cuyo resultado es la amplificación de la señal, que, en último término, modula la transcripción de genes (Chua JJE et al, 2010). Para un funcionamiento correcto de la sinapsis, tanto el elemento pre- como el postsináptico deben disponer de sus diferentes componentes en el momento adecuado; es decir, el desarrollo y maduración de la sinapsis requiere un estricto control durante su formación en ambos lados de la hendidura (Revisado en Collins y DiAntonio, 2007; Oswald y Sigrist, 2009).



**Figura I3. Estructura de una sinapsis química.**

Este tipo de sinapsis transmite la señal a través de neurotransmisores que son liberados desde la neurona presináptica y captados en la postsináptica a través de diferentes tipos de receptores (Tomado de Purves et al., 2004).

### 2.2.1. Zona activa en el compartimento presináptico.

Las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana en una región especializada del lado presináptico denominada zona activa (AZ). Esta zona activa se compone de una matriz electrodensa llamada citomatriz de la zona activa (CAZ; Desbrach et al., 2001). La estructura de la AZ varía según la especie, teniendo en *Drosophila* forma de T que es característica de las sinapsis de los dípteros (Zhai y Bellen, 2004). Además, en la AZ se localizan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.

Las proteínas de la CAZ se dividen en 5 clases: UNC3/Munc13, RIMs (Moléculas que interaccionan con Rab3), ELKS, Bassoon y Piccolo, y liprin  $\alpha$ .

#### 2.2.1.1. UNC3/Munc13.

Son proteínas con diferentes dominios que interaccionan con diacilglicerol, RIM, calmodulina, syntaxina, etc. (Revisado en Schoch y Gundelfinger; 2006). Estudios genéticos en *C. elegans*, *Drosophila* y ratón han establecido que estas proteínas son esenciales para la maduración y adquisición de un estado competente de las vesículas sinápticas, que les permite ser liberadas (Revisado en Schoch y Gundelfinger; 2006).

#### 2.2.1.2. RIMs

Son proteínas multidominio con una función de anclaje a otras proteínas y que fueron descubiertas por su interacción con Rab – 3 (una proteína pequeña que se une a vesículas sinápticas; Wang et al, 1997). En *Drosophila*, se ha descubierto recientemente una proteína que se une a RIM (DRBP) y que es esencial tanto para el mantenimiento de la estructura de la AZ como para la exocitosis del neurotransmisor (Liu et al., 2011).

#### 2.2.1.3. ELKS.

Su nombre se debe a que son proteínas con alto contenido en glutamato (E), leucina (L), lisina (K) y serina (S). Tienen un papel estructural y en mamíferos son necesarias para la

localización de RIM en la AZ (Ohtsuka et al., 2002).

En *Drosophila*, la proteína Bruchpilot (Brp) presenta un 67% de homología con la región N – terminal de ELKS pero no con su región C – terminal (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Brp forma parte intrínseca de las AZ en *Drosophila* y los mutantes de falta de función no presentan la forma en T característica de la AZ, tienen una menor densidad de canales de calcio y disminuyen la amplitud de su potenciales de acción (Kittel et al., 2006).

#### 2.2.1.4. Bassoon y Piccolo.

Ambas proteínas están relacionadas estructuralmente ya que comparten un dominio llamado PBH (definido como dominio de homología de Piccolo y Basson) y tienen un alto peso molecular (420 y 530 Kda). Además, Piccolo tiene un dominio de unión PDZ y Basson puede ser modificado de forma postraducciona. Sólo se han encontrado en mamíferos (Revisado en Schoch y Gundelfinger; 2006) y pueden interaccionar con las ELKS (Takao-Rikitsu et al., 2004). Estas proteínas son necesarias para el ensamblaje y funcionamiento de varios tipos de sinapsis (Khimich et al., 2005) y el tráfico de membranas (Kim et al., 2003).

#### 2.2.1. 5. Liprin $\alpha$ .

Las liprinas (Lip) fueron identificadas porque se unían a las proteínas tirosina fosfatasa LAR (antígeno relacionado con leucocitos) en las uniones focales (Serra – Pages et al., 1995). Estudios en *C. elegans* y *Drosophila* han demostrado su papel en el mantenimiento y formación de las zonas activas (Kaufmann et al., 2002; Zhen y Jin, 1999). Las liprinas interaccionan con otros componentes de la CAZ como RIM y ELKS. En *Drosophila*, sus mutantes exhiben sinapsis de mayor tamaño y la estructura de la AZ es aberrante (Kaufmann et al., 2002).

#### 2.2.2. Hendidura sináptica.

La hendidura sináptica separa el lado presináptico del postsináptico (**Figura I3**). Mide entre 20 – 24 nm y está compuesta por complejos trans–sinápticos que unen ambas neuronas. Estos complejos están formados por moléculas de adhesión como cadherinas, N – CAM (Fascicilina II en *Drosophila*; Schuster et al., 1996a), Neuroligina – Neurexina (Owald et al., 2012), etc.

















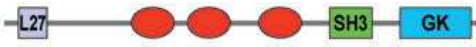





### 2.2.3. Compartimento postsináptico.

La membrana postsináptica está compuesta por una estructura organizada y compleja que cambia su composición a lo largo del desarrollo o en respuesta a la actividad sináptica (Rasse et al., 2005; Gutierrez et al., 2009) llamada densidad postsináptica (PSD). La PSD está yuxtapuesta a la AZ y en ella se localizan, en grandes concentraciones, los receptores de neurotransmisores. Existen diferencias morfológicas acusadas en las PSDs. Así en vertebrados, mientras las sinapsis glutamatérgicas (descritas posteriormente en detalle) presentan una PSD muy prominente por lo que se denominan sinapsis asimétricas, las sinapsis inhibitorias no tienen ese grosor tan acusado de la membrana denominándose sinapsis simétricas (Gray, 1959; Colonnier, 1968).

En la PSD de las sinapsis glutamatérgicas se localizan tres tipos de receptores: los de tipo AMPA (ácido  $\alpha$  – amino – 3 – hidroxil – 5 – metil – 4 – isoxazoleproico), de tipo NMDA (N – metil – D – aspartato) y de Kainato que permiten la entrada de iones de  $\text{Na}^+$  (y  $\text{Ca}^{2+}$  en el caso de los NMDA) permitiendo la despolarización de la membrana postsináptica. Los de tipo AMPA median la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos y los de tipo NMDA regulan la plasticidad sináptica (Revisado en Sheng y Hoogenraad, 2007). Además, en la PSD se localizan receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), moléculas de adhesión como NCAM, proteínas del citoesqueleto como la Actina y sobre todo un gran número de proteínas estructurales (Revisado en Sheng y Hoogenraad, 2007). Entre ellas, destaca PSD – 95, cuyo homólogo en *Drosophila* es Discs Large (Dlg). Dlg es un miembro de la familia MAGUK (Quinasas guaniladas asociadas a membrana) y se localiza en la unión neuromuscular larvaria (NMJ). Se une a los receptores NMDA y puede interaccionar a través de su dominio PDZ con múltiples proteínas (Wang et al., 2010). La **tabla II** muestra un resumen de las principales proteínas que forman la PSD de mamíferos con sus funciones (Revisado en Sheng y Hoogenraad, 2007).



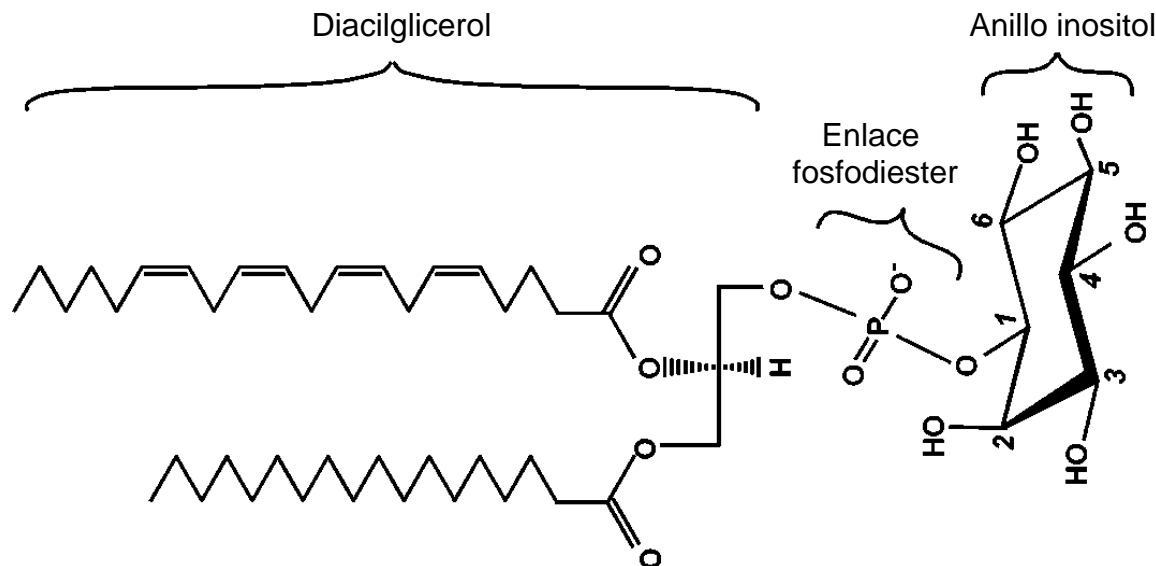
Tabla I1. Principales proteínas localizadas en la PSD glutamatergica.

Protein	Stoichiometry	Domain structure	Description—Function
$\alpha$ -Actinin			Actin-binding protein that interacts with several PSD proteins, including NR2B and CaMKII—regulates spine morphogenesis (145)
AKAP79/150	20		PSD-95/SAP97-associated A-kinase-anchoring protein that binds to protein kinase A and PP1 (151)
CaMKII $\alpha/\beta$	5600		Abundant postsynaptic Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent serine/threonine kinase important for synaptic plasticity (79)
N-cadherin			Calcium-dependent homophilic adhesion molecule—involved in synapse and dendrite development (150)
$\beta$ -Catenin			Signaling protein that links N-cadherin to the actin cytoskeleton (150)
Cortactin			Actin-binding protein and activator of the Arp2/3 actin nucleation machinery—interacts with Shank, regulates spine morphogenesis (144)
Densin-180			Leucine-rich repeat and PDZ domain-containing protein—interacts with $\delta$ -catenin, Shank, CaMKII $\alpha$ , $\alpha$ -actinin (145)
GluR1/2/3	60		Subunits of AMPA-type glutamate receptor channels
Homer1/2/3	60		Adaptor proteins that bind to Shank and several other postsynaptic proteins, including mGluR1/5 (98)
IRSp53	80		Adaptor protein that binds to PSD-95 and Shank—links activated Rac1/Cdc42 to actin regulation, involved in spine morphogenesis (149)
Kalirin7			PSD-95-associated RhoGEF—regulates actin cytoskeleton and dendritic spine morphogenesis (143)
mGluR1/5	20		Metabotropic glutamate receptors, G protein-coupled receptors for glutamate
Neurabin-I/spinophilin			Scaffold proteins that bind to PP1 and actin—regulate synaptic function, plasticity, and spine morphology (146)
Neurologin			Postsynaptic adhesion molecule that binds to presynaptic neuexin—involved in formation and development of synapses (142)
NR1/NR2A/NR2B	20		Subunits of NMDA-type glutamate receptor channels
PSD-95	300		PDZ scaffold protein that regulates synaptic plasticity (58, 59)
SAP97	10		Scaffold protein of the PSD95 family that regulates synaptic function (58, 93)
SAPAP1-4/GKAP	150		Abundant multidomain scaffold that links PSD-95 with Shank (58)
Septin7			GTP-binding protein that forms polymers (148)
Shank1/2/3	150		Scaffold proteins that bind to GKAP and Homer—promote morphological and functional maturation of synapse and dendritic spine (58, 80)
SPAR			RapGAP that binds to PSD-95—regulates actin and spine morphogenesis (102)
SynGAP	360		Abundant RasGAP that binds to PSD-95—regulates MAP kinases and synaptic function and development (147)

### 3. FOSFOINOSÍTIDO 3 – QUINASA (PI3K) Y OTRAS QUINASAS.

#### 3.1. FOSFOINOSITIDOS.

El fosfatidilinositol (PtdIns) está compuesto por un anillo inositol, fosforilado en la posición 1 (Ins1P) y unido a diacilglicerol a través del grupo fosfato (**Fig. I4**). El inositol tiene 5 hidroxilos libres que pueden ser fosforilados. Sin embargo, solo 3 de los 5 hidroxilos son fosforilados *in vivo*, formando fosfoinosítidos (PI) (Vanhaesebroeck et al, 2001). Existen 8 PI en células eucariotas que se localizan en las membranas y son sustratos de diferentes quinasas, fosfatasas y lipasas (**Fig. I5**). Además, los fosfoinosítidos tienen funciones muy importantes como modular el ciclo vesicular en los terminales sinápticos (revisado en Cremona y Camilli, 2001), reclutar proteínas en la membrana para su estabilización o activación (Yu et al., 2012), regular el tráfico de membrana (D'Angelo et al., 2012) y están implicadas en la formación y fusión de vesículas (revisado en Chasserot – Golaz et al., 2010; Wen et al., 2011)

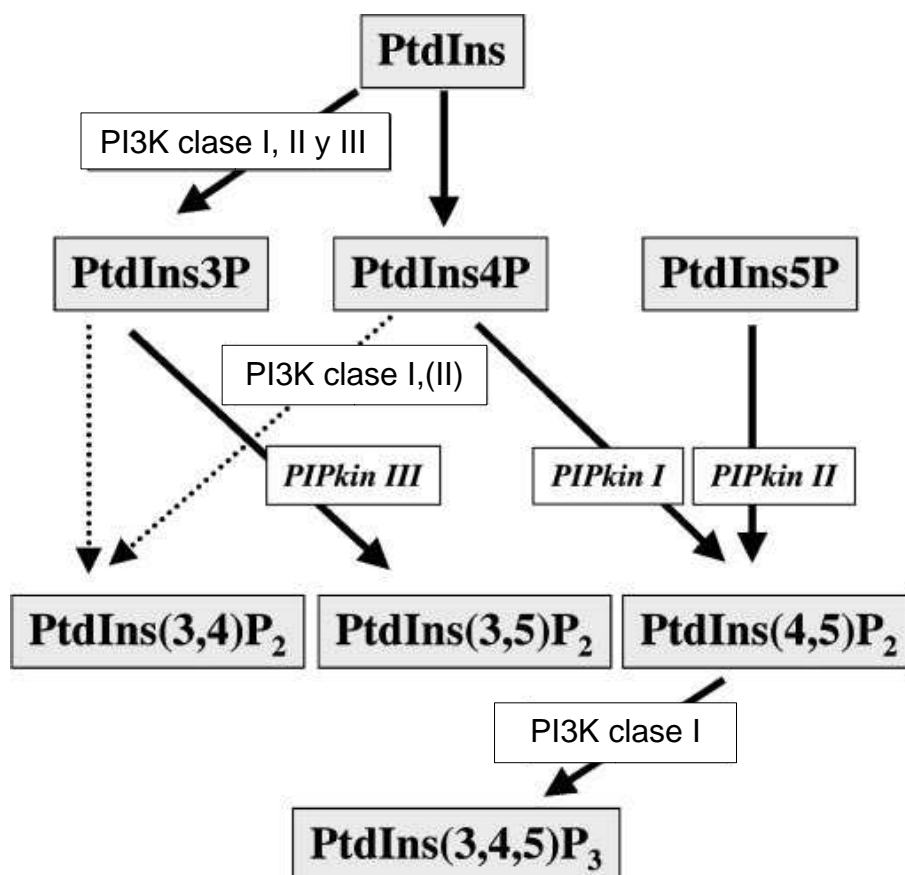


**Figura I4. Estructura de los fosfoinosítidos.** El anillo inositol, que se localiza en el citoplasma, se une mediante el enlace fosfodiéster al diacilglicerol que se inserta en la bicapa lipídica (Modificado de Vanhaesebroeck et al., 2001).

Las lípidos quinasas fosforilan lípidos en una posición determinada. Las fosfoinosítido 3 – quinasas (PI3Ks) fosforilan el anillo de inositol en posición 3 utilizando 3 diferentes sustratos:



PtdIns, PtdIns4P y PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (**Fig. I5**). Estos 3 – PtdIns son segundos mensajeros de diferentes vías (Ver apartado 4.7; Vanhaesebroeck et al, 2001).



**Figura I5. Reacciones catalizadas por las PI quinazas.** Las flechas en negritas indican la síntesis de los 3 – PI en las células. PIPkin = PIP quinazas (Modificado de Vanhaesebroeck et al., 2001).

### 3.2. CLASES DE PI3K.

Existen 3 clases diferentes de PI3K, según el sustrato al que fosforilan, y a su vez se dividen en subunidades reguladoras y catalíticas. Las catalíticas comparten una región compuesta por el núcleo catalítico, el dominio helicoidal o PIK (dominio homólogo de la quinasa PI) y un dominio C2 (**Fig. I6**; Ver apartado 4.3; Revisado en Vanhaesebroeck et al., 1997 y Vanhaesebroeck et al., 2001).

#### 3.2.1. Clase I de PI3K.

Están formadas por heterodímeros de una subunidad catalítica llamada p110, por su peso molecular de 110 KDa, y por una subunidad reguladora, llamada p85. Esta clase I cataliza la conversión de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> *in vivo*. Se subdivide en clases IA y IB dependiendo

de si son activadas por receptores tirosina quinasa (IA) o por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, IB; **Fig. I6**). Todas las PI3K de esta clase pueden ser activadas por Ras (Revisado en Vanhaesebroeck et al., 2001).

#### 3.2.1.1. Clase IA de PI3K.

En la PI3K de clase IA, la p110 aparece bajo tres isoformas (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  o p110 $\delta$ ) codificadas por tres genes distintos (*pi3kca*, *pi3kcb* y *pi3kcd*, respectivamente). Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  presentan un patrón de expresión general mientras que  $\delta$  es exclusiva de leucocitos. Por su parte, la subunidad reguladora p85 está formada al menos por cinco isoformas codificadas por 3 genes diferentes. Las formas mas abundantes p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$  y p50 $\alpha$  se generan por inicios de transcripción alternativos de un solo gen, el *pi3kr1*, mientras que las isoformas menos abundantes, p85 $\beta$  y p55 $\gamma$  están codificadas por los genes *pi3kr2* y *pi3kr3* respectivamente. Las tres isoformas mayoritarias son de expresión ubicua mientras que la p55 $\gamma$  es la única específica del sistema nervioso. La subunidad p85 es esencial para la estabilización, activación y reclutamiento en membrana del complejo PI3K y contiene dos dominios de homología con Src llamados SH2 a través de los cuales el complejo PI3K interacciona con el receptor tirosina quinasa fosforilado, reclutando PI3K cerca de sus sustratos lipídicos en la membrana plasmática (**Fig. I6**; Fougerat, Gayral et al., 2009). De esta forma, PI3K se localiza en la membrana donde se encuentran sus sustratos. En *Drosophila*, solo existe una subunidad catalítica, la Dp110, homóloga de la p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , y una reguladora (p60), homóloga de la p85 $\alpha$  (MacDougall et al., 1995).

#### 3.2.1.2. Clase IB de PI3K.

Esta categoría se compone de la subunidad catalítica p110 $\gamma$  y su proteína reguladora 101 (llamada así por su peso molecular) y son activadas por GPCRs (Stephens et al., 1994;**Fig. I6**).

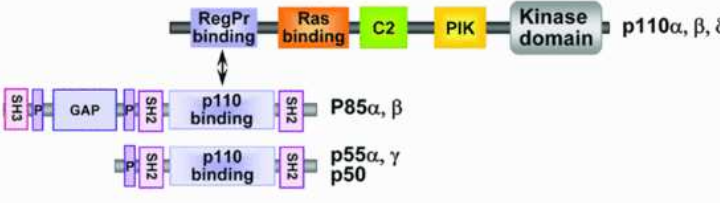
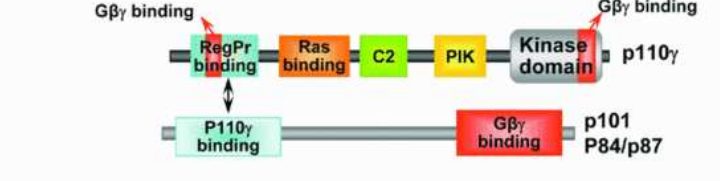

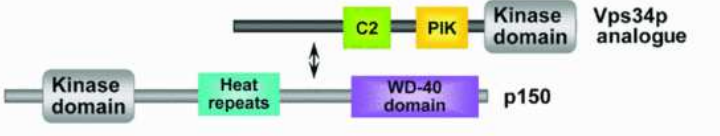
#### 3.2.2. Clase II de PI3K.

Las enzimas de esta categoría tienen un peso molecular de 170 KDa y no se unen a ninguna molécula adaptadora (Revisado en Falasca y Maffucci, 2012; Vanhaesebroeck et al., 2001). *In vitro*, tienen preferencia por fosforilar PtdIns (**Fig. I5**). Tres isoformas están presentes en mamíferos

(PI3K – C2 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) mientras que en *Drosophila* y *C. elegans* sólo se ha descrito una isoforma (Revisado en Falasca y Maffuci, 2012).

### 3.2.3. Clase III de PI3K.

En esta clase III, se incluyen las PI3K homólogas de la proteína vesicular de levadura que está implicada en el tráfico de endosomas hacia la vacuola (Vps34p; Herman y Emr, 1990). Las PI3K de tipo III también fosforilan *in vivo* PtdsIns, transformándolos en PtdsIns3P. Esta clase interviene en el tráfico celular. Todas las especies de eucariotas tienen PI3K de esta clase (**Fig. I6**; revisado en Vanhaesebroeck et al., 2012).

Tipos de PI3K	Regulación
<p><b>Clase IA</b> <math>PI(4,5)P_2 \rightarrow PI(3,4,5)P_3</math></p> 	<p>Tirosina quinasas Ras Gβγ</p>
<p><b>Clase IB</b> <math>PI(4,5)P_2 \rightarrow PI(3,4,5)P_3</math></p> 	<p>Ras Gβγ</p>
<p><b>Clase II</b> <math>PI(4)P \rightarrow PI(3,4)P_2</math></p> 	<p>Tirosina quinasas Quimioquina</p>
<p><b>Clase III</b> <math>PIP \rightarrow PI(3)P</math></p> 	<p>Constitutivo?</p>

**Figura I6. Clases de PI3K.** En la tabla, se muestra la estructura de los 3 tipos de PI3K. Además, se indica por qué otras proteínas es regulada cada una de las clases (Modificado de Fougéral, Gayral et al, 2009).

### 3.3. ESTRUCTURA DE PI3K.

En esta sección, se describe de forma breve dos de los principales dominios (**Fig. I6**) que comparten las diferentes clases de PI3K así como la función de cada uno de ellos.

#### 3.3.1. Dominio catalítico.

El dominio catalítico está organizado en dos lóbulos: N – terminal y C – terminal. El primero está compuesto por el bucle de unión de nucleótidos y el residuo de lisina necesario para la unión y activación del ATP. Esta lisina se une al fosfato  $\alpha$  del ATP y es necesario para el correcto alineamiento de la cadena trifosfato dentro del sitio activo. El C – terminal contribuye a la unión del ATP y contiene el dominio de activación que determina la especificidad de los sustratos de PI3K (Walker et al., 1999; Revisado en Vanhaesebroeck et al., 2001).

#### 3.3.2. Dominio de unión a Ras.

Ras ejerce su efecto a través de una interacción dependiente de GTP con numerosas dianas celulares como Raf y las PI3K de clase I. Ras interacciona con PI3K a través del dominio de unión a Ras (RBD) y, al menos en el caso de p110 $\gamma$ , también se une al dominio catalítico de la región C – terminal (**Fig. I6**). La unión a Ras induce cambios en el dominio C2 y en el C – terminal del dominio catalítico para facilitar el reclutamiento a la membrana (Revisado en Vanhaesebroeck et al., 2001).

### 3.4. DIANAS DE PI3K: LA PROTEÍNA AKT.

AKT o proteína quinasa B (PKB) es una Serina/Treonina quinasa que contiene un dominio PH (Homólogo de Pleckstrina) y se expresa de forma ubicua. El dominio PH está presente en más de 100 proteínas y forma parte de los efectores más comunes de las PI3K de clase I. Este dominio PH le permite ser un efector directo de los PtdIns y, por ende, de PI3K. Tanto PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> como PtdIns (3,4)P<sub>2</sub> pueden unirse al dominio PH de AKT y facilitar la fosforilación de la Thr308 (Thr342 en *Drosophila*) por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK – 1; Alessi et al., 1997). Además de esta fosforilación, AKT necesita ser fosforilada en la Ser473 (Ser505 en *Drosophila*)

para estar completamente activa (Alessi et al., 1996a). Esta segunda fosforilación se produce por el complejo diana para la rapamicina 2 de mamíferos (mTORC2; Sarbassov et al., 2005).

Existen más de 100 proteínas que poseen el sitio consenso para ser fosforiladas por AKT (Alessi et al, 1996b), entre ellas, se encuentran: GSK3, reguladores del ciclo celular como p21 y p27 y también TSC2 (Proteína de la tuberosis esclerosa 2). Debido a la cantidad de sustratos posibles, AKT tiene múltiples funciones celulares por debajo de PI3K como el crecimiento, la síntesis de ADN, la apoptosis y reordenamientos del citoesqueleto de actina entre otros (ver apartado 3.7; Revisado en Coffey et al., 1998 y Vanhaesebroeck et al., 2012). En los últimos años, se ha descrito una nueva función de AKT en *Drosophila* y mamíferos: la sinaptogénesis (Martín – Peña et al., 2006 y Cuesto et al., 2011). Por debajo de AKT, se situaría una GTPasa de la familia de Ras llamada Rheb (Homólogo de Ras enriquecido en cerebro) que también presenta actividad sinaptogénica (Martín – Peña et al., 2006).

### 3.5. GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK3).

GSK3 tiene dos isoformas en mamíferos (GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ ) mientras que solo existe una homóloga de ambas en *Drosophila* codificada en el gen *shaggy* (*sgg*). Para ser activada, necesita ser fosforilada en la Tyr216 (GSK3 $\beta$ ) o la Tyr279 (GSK3 $\alpha$ ) por otras tirosina – quinasas o mediante autofosforilación (Frame y Cohen, 2001; Revisado en Jope y Johnson, 2004). En contrapartida, si GSK3 es fosforilada en su región N – terminal por AKT u otras quinasas en la Ser9 (GSK3 $\beta$ ) o la Ser21 (GSK3 $\alpha$ ), su actividad se reduce de forma drástica. GSK3 tiene una expresión ubicua, mayoritaria en el citosol aunque también está presente en el núcleo, donde regula diversos factores de transcripción, así como en la mitocondria. La actividad y cantidad de GSK3 en los compartimentos fuera del citosol es regulada por AKT (Bijur y Jope, 2001; Bijur y Jope, 2003; Revisado en Jope y Johnson, 2004).

Por otro lado, GSK3 tiene múltiples funciones, muchas de ellas antagónicas a las de PI3K – AKT, entre las que se encuentran: la neuritogénesis, el crecimiento del cono axonal (en donde su activación colapsa el cono de crecimiento y su inhibición produce sobrecrecimiento del mismo, Eickholt et al, 2002; Lucas et al., 1998), la supervivencia y la muerte celular, etc. (Revisado en

Yoshimura et al., 2006). Asimismo, GSK3 es un represor tanto de la vía de la Insulina como de la vía de Wnt (Papadopoulou, 2004). Esta última es fundamental para la formación de sinapsis (Salinas, 2005) a través de Futsch (homólogo en *Drosophila* de MAP1B, proteína asociada a microtúbulos 1B) que también está regulado por GSK3. Además, GSK3 regula negativamente el crecimiento de la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila* solamente en la motoneurona, no en el músculo (Franco et al., 2004). Estos resultados indican que GSK3 es fundamental para la formación de sinapsis. De hecho, al contrario que AKT, tiene un papel antisinaptogénico en *Drosophila* (Martín – Peña et al., 2006). Por último, su desregulación ha sido implicada en múltiples enfermedades como la hipertrofia muscular, el cáncer, el trastorno bipolar, la esquizofrenia o el Alzheimer (Revisado en Jope y Johnson, 2004).

### 3.6. FUNCIONES DE PI3K.

PI3K es una proteína central del metabolismo con múltiples funciones como el crecimiento (Leevers et al., 1996), la proliferación (Klippel et al., 1998), la síntesis de ADN (Fant et al., 1992; Valius y Kazlauskas, 1993), la protección frente apoptosis a través de AKT (Bi et al., 1999), los reordenamientos del citoesqueleto de actina (Servant et al., 2000), la adhesión celular (Gray et al., 1999; Geiger et al., 2000), etc. Además, está implicada en la formación de sinapsis junto con AKT (Martín – Peña et al., 2006).

#### 3.6.1. Formación de sinapsis.

En los últimos años, se ha demostrado que la actividad de PI3K juega un papel relevante en el control del número de sinapsis en neuronas del SNC (Acebes et al., 2011) o motoneuronas de la unión neuromuscular larvaria de *Drosophila* (Martín – Peña et al., 2006). La sobreexpresión de las proteínas PI3K y AKT así como la bajada de TSC2 (Canal et al., 1994; Acebes y Ferrús, 2001) es sinaptogénica, es decir, aumenta el número de sinapsis mientras que GSK3 juega un papel antisinaptogénico disminuyendo la cantidad de sinapsis. Esta vía sinaptogénica comparte algunos elementos de la vía de la Insulina (mencionados anteriormente) pero no todos. Así el receptor de insulina, PTEN (Homólogo de tensina y fosfatasa), FoxO y TOR (Diana de rapamicina) no tendrían un papel en la sinaptogénesis (Martín – Peña et al., 2006; Martín – Peña, 2007). Las nuevas sinapsis inducidas por PI3K son funcionales y dan lugar a cambios en el comportamiento locomotor y

olfativo (Martín – Peña et al., 2006; Acebes et al., 2011; Revisado en Acebes y Morales, 2012). Asimismo, esta formación de sinapsis es inducible tanto en el desarrollo como en individuos de edad avanzada (ver resultados y Martín – Peña et al., 2006).

### **3.6.2. Conservación de la vía sinaptogénica en vertebrados.**

En mamíferos, es posible aumentar la activación de PI3K de una manera controlada mediante el péptido PDT4 – PI3KAc que induce un incremento en la cantidad de AKT fosforilado (Cuesto et al., 2011). Esta estimulación de PI3K aumenta el número de espinas dendríticas en neuronas de hipocampo en cultivo, independientemente del tipo de sinapsis, la edad del cultivo o la densidad celular. Además, la activación de PI3K en estas neuronas aumenta la liberación espontánea de neurotransmisor, la cantidad de sinapsina (una proteína presináptica de vesículas; Südhof, 2004) y de la anteriormente mencionada PSD95. Asimismo, si se inyecta intraventricularmente el péptido PDT4 – PI3KAc en cerebro de ratas *in vivo* se producen cambios en su memoria contextual asociativa (Cuesto et al., 2011; Revisado en Acebes y Morales, 2012).

### **3.6.3. PI3K y la inserción de receptores en la membrana.**

En mamíferos, PI3K ha sido localizada de manera constitutiva en la sinapsis por medio de una interacción directa entre la subunidad reguladora p85 y los receptores AMPA. Tanto la actividad de PI3K como la disponibilidad de PIP<sub>3</sub> son necesarios para la localización de nuevos AMPAR en las PSDs así como su inserción en la membrana debido a la activación de los NMDAR (Man et al., 2003; Arendt et al., 2010; revisado en Acebes y Morales, 2012).

### **3.6.4. PI3K y ciclo vesicular.**

Los fosfoinosítidos son importantes moduladores del ciclo vesicular en los terminales presinápticos (revisión de Cremona y de Camilli, 2001). Existen evidencias experimentales que implicarían directamente a PI3K en la regulación del ciclo vesicular. Usando células granulares del cerebelo, se ha demostrado que p85 es capaz de formar un complejo con Sinapsina (proteína vesicular que une actina) y tanto la disrupción de este complejo como la inhibición de PI3K mediante la Wortmanina, inhiben el transporte de vesículas hacia la zona activa reduciendo la

liberación de neurotransmisor a altas frecuencias de estimulación (Cousin et al., 2003). En un sistema experimental distinto, la unión neuromuscular de rana, la Wortmanina desorganiza el citoesqueleto de actina de los terminales presinápticos y de esta manera reduce la liberación vesicular (Richards et al, 2004).

### **3.6.5. PI3K en memoria espacial.**

La relación con los procesos de memoria y aprendizaje viene sugerida por una serie de experimentos *in vivo*. La perfusión de inhibidores de PI3K (LY294002 o Wortmanina) en el área de CA1 del hipocampo o en la amígdala de ratones, inhibe la consolidación y recuperación de la memoria contextual en un protocolo de condicionamiento por miedo (Chen et al., 2005; Lin et al., 2001). Un estudio donde se han combinado pruebas de comportamiento y evaluaciones histológicas en cerebros del ratón *knock-out* de p85 $\alpha$ , ha proporcionado la primera evidencia de que la ausencia de p85 $\alpha$  produce deficiencias en el aprendizaje y la motivación además de una severa reducción en la cantidad de axones mielinizados y de sinapsis en córtex e hipocampo (Tohda et al., 2006).

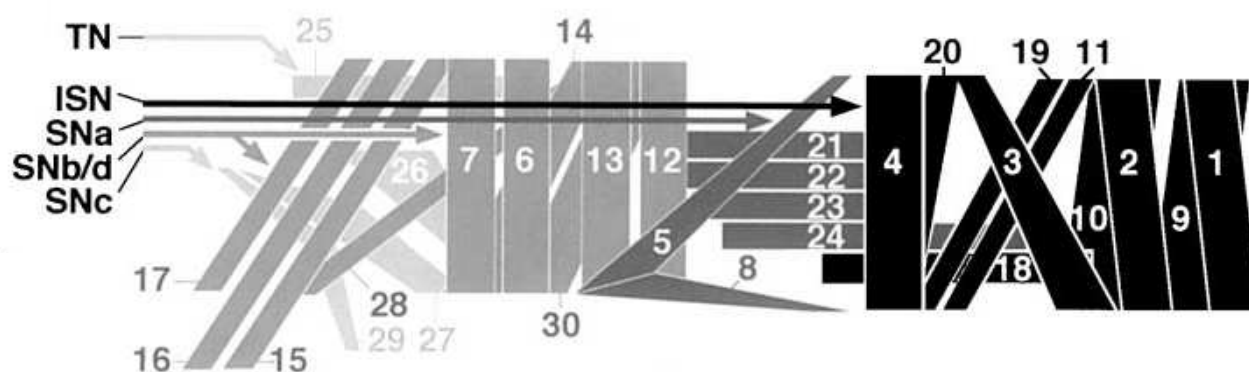
### **3.6.6. PI3K en plasticidad sináptica.**

La activación de la vía de señalización PI3K – AKT – mTOR es esencial para la regulación de la síntesis de PSD95 en dendritas e implica un nuevo mecanismo molecular que puede contribuir a la modulación sináptica por la insulina en el área de hipocampo CA1 (Lee et al., 2005). Además, la plasticidad sináptica a largo plazo (LTP) también se regula mediante activación de PI3K, aunque posiblemente relacionada con la activación de receptores de NGF (Factor de crecimiento nervioso). Así, la perfusión de inhibidores de PI3K inhibe reversiblemente la expresión de la LTP en CA1 sin afectar el establecimiento ni la fase de expresión (LTP postsináptica) (Sanna et al., 2002; Opazo et al; 2003).



## 4. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA EN EL ESTUDIO DE LA SINAPTOGÉNESIS.

La unión neuromuscular larvaria (NMJ) de *Drosophila melanogaster* ha sido utilizada para estudiar los mecanismos moleculares que controlan la morfología y plasticidad sinápticas debido a su accesibilidad mediante el uso de diferentes técnicas como electrofisiología, inmunohistoquímica, imaginería de  $\text{Ca}^{2+}$  o en estudios del comportamiento. Además, es posible controlar de manera espacio – temporal la expresión de genes. El sistema está formado, en cada segmento, por 32 motoneuronas que inervan 30 músculos postsinápticos de forma estereotipada (**Fig. I7**). Además, el patrón de ramificación es siempre el mismo permitiendo comparar siempre la misma NMJ en diferentes individuos con resolución de célula única (Revisado en Collins y Diantonio, 2007; Hoang y Chiba, 2001). Este patrón de ramificación se caracteriza por la formación de unas especializaciones de membrana denominadas botones. Existen 4 tipos de botones dependiendo de su tamaño y bioquímica: Ib, Is, II y III. Los de tipo Ib son grandes (3 – 6  $\mu\text{m}$ ) y se encuentran en terminales cortos mientras que los Is son más pequeños (2 – 4  $\mu\text{m}$ ) y presentan una ramificación más elaborada. Ambos tipos de botones son glutamatérgicos y están presentes en todos los músculos. Los botones de tipo II también son pequeños (1 – 2  $\mu\text{m}$ ), se localizan en la mayoría de los músculos y están presentes en ramificaciones largas. Parecen ser glutamatérgicos y octopaminérgicos. Por último, los botones de tipo III tienen un tamaño medio (2 – 3  $\mu\text{m}$ ) y contienen insulina. Solo se han descrito en las motoneuronas que inervan el músculo 12 (Hoang y Chiba, 2001; Martínez – Pradón y Ferrús, 1997).



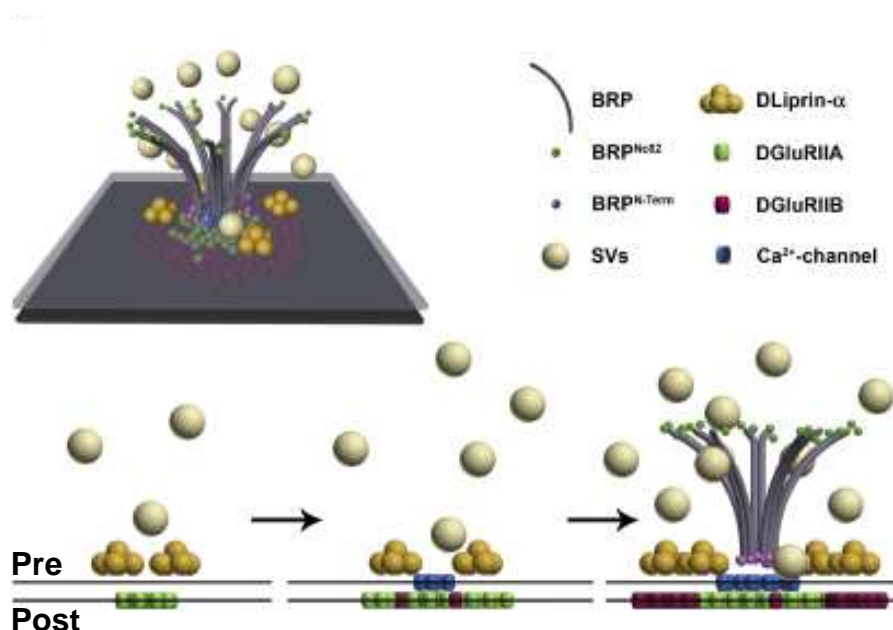
**Figura I7. Sistema neuromuscular larvario.** Se muestran la disposición de los 30 músculos así como los diferentes nervios, donde se agrupan las motoneuronas, que los inervan. TN: Nervio transversal ISN: Nervio intersegmental SNa: Nervio segmental a. SNb/d: Nervio segmental b y d. SNc: Nervio segmental c. (Tomado de Hoang y Chiba, 2001).

La NMJ posee características similares a las del cerebro de mamíferos siendo sus sinapsis de tipo glutamatérgico con receptores de glutamato del tipo ionotrópico AMPA/Kainato (DiAntonio, 2006). Estos receptores postsinápticos median la transmisión excitatoria rápida también en el SNC de mamíferos. En la NMJ larvaria, se componen de cinco subunidades diferentes (GluRIIA a GluRIIE) (DiAntonio et al., 1999; Featherstone et al., 2005; Marrus et al., 2004; Petersen et al., 1997; Qin et al., 2005) y se dividen en dos clases: los receptores que contienen la subunidad GluRIIA y los que contienen la GluRIIB (DiAntonio, 2006). La presencia de una u otra subunidad les confiere propiedades electrofisiológicas diferentes. Además, su regulación también varía en función de la composición de los receptores. La subunidad IIA puede ser fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) y los GluRIIB necesitan la proteína Discs Large (Dlg) para localizarse en la superficie de la membrana (Revisado en DiAntonio, 2006; Thomas et al, 2010). Recientemente, la formación y el crecimiento dinámico de estos receptores ha sido estudiado *in vivo* en la NMJ. Acoplando dichos receptores a diferentes fluoróforos [GFP (Proteína verde fluorescente) o RFP (Proteína rojo fluorescente)] y con el empleo de la técnica denominada FRAP (Recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo) es posible estudiar la dinámica espacio – temporal de esos receptores. Además, se ha demostrado que la cantidad y localización de los receptores de tipo GluRIIA o GluRIIB en las densidades postsinápticas es diferente según el momento del desarrollo (Rasse et al, 2005). Las nuevas sinapsis, así como las que están creciendo, son ricas en GluRIIA y a medida que la PSD madura incorporan receptores de tipo GluRIIB. Finalmente, las PSDs maduras tienen un balance entre ambos tipos de receptores (Schmid et al, 2008; **Fig. I8**).

Las proteínas presinápticas de la AZ en la motoneurona larvaria también han sido caracterizadas. Brp es el homólogo de ELKS en mamíferos (ver apartado 2.2.1.3.). BRP está presente en cada una de las AZ formando la estructura en forma de T característica de las sinapsis de *Drosophila*, siendo necesaria para la correcta localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación sináptica (Kittel et al., 2006 y Wagh et al., 2006; **Fig. I8**). Asimismo, la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal frente a esta proteína permite marcar las AZ (de aquí en adelante las llamaremos sinapsis; Collins y DiAntonio, 2007) individualmente y cuantificar su número por motoneurona (Martín – Peña et al., 2006; Romero – Pozuelo et al., 2007 y Jordán – Álvarez et al., 2012).

Otras proteínas importantes de las sinapsis son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , codificados en el gen

*cacophony* (*cac*) y que disparan el proceso de la liberación del neurotransmisor (Kawasaki et al., 2000). Por otra parte, la Liprina  $\alpha$  (ver apartado 2.2.1.5.; **Fig. I8**) y la D-Syd1 (Sinapsis defectuosa 1) también forman parte de estas sinapsis, localizándose alrededor de Brp (Fouquet et al., 2009) y siendo necesarias para de los distintos constituyentes sinápticos (Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010). Recientemente, el estudio *in vivo*, mediante diferentes proteínas fluorescentes, de la larva de *Drosophila* ha permitido conocer cómo se produce el ensamblaje de las sinapsis (Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010; **Fig. I8**).



**Figura I8. Ensamblaje de las sinapsis *in vivo*.** En el esquema se muestra la localización de cada una de las proteínas que forman la sinapsis así como el orden temporal en el que cada una de ellas aparece en la sinapsis (Modificado de Fouquet et al., 2009).

En la NMJ, no sólo es importante como se forman las sinapsis si no también la regulación del crecimiento del terminal sináptico de manera trans-sináptica durante el desarrollo. En *Drosophila*, esta regulación se produce por la vía de Wingless (Wg) y su receptor Frizzled (Fz) (señalización anterógrada) y por la vía de Wishful Thinking (Wit) y su ligando Glass bottom boat (Gbb) (señalización retrógrada). Los mutantes de Wg presentan defectos en la morfología de los terminales sinápticos como por ejemplo botones sin zonas activas y deslocalización de los GluRIIs (Revisado en Collins y DiAntonio, 2007). Por su parte, los mutantes de la vía de Wit/Gbb presentan un menor número de botones, deficiencias electrofisiológicas y menos sinapsis por botón (Revisado en Marqués, 2005; ver Resultados).



## **OBJETIVOS**



El laboratorio está interesado en conocer cómo se forman las nuevas sinapsis y cómo se controla su número. Por ello, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido intentar descubrir cuáles son los mecanismos dependientes de PI3K implicados en la formación de las nuevas sinapsis *in vivo* y qué otros elementos participan con PI3K en esta vía de señalización sinaptogénica. Este conocimiento permitiría ahondar en los mecanismos responsables de la modulación de la sinaptogénesis.

Este proyecto aborda cuatro objetivos/preguntas básicas:

1. ¿Las proteínas sinaptogénicas, PI3K y AKT, así como la antisinaptogénica, GSK3, actúan en una misma vía o sus efectos son aditivos y, por lo tanto, pertenecen a vías diferentes?
2. ¿Cuáles son los efectores y/o sustratos de PI3K en la vía sinaptogénica?
3. ¿Otras proteínas relacionadas previamente con la sinaptogénesis y/o el crecimiento del terminal axónico actúan en conjunción o son independientes de la vía sinaptogénica de PI3K?
4. La formación de nuevas sinapsis dependientes de PI3K ¿influye en el dinamismo y la maduración de la zona postsináptica?





## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. ESTIRPES DE *DROSOPHILA*.

Todas las estirpes empleadas de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron según procedimientos estándar de laboratorio (Roberts, 1986) y fueron obtenidas de los centros de estirpes de VDCR (Viena, <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>), o de Bloomington (Indiana; <http://flystocks.bio.indiana.edu/>) o facilitadas por otros laboratorios. Todos los cruces han sido mantenidos a 25°C excepto en los experimentos en donde se ha necesitado emplear otra temperatura.

A continuación, se enumeran los principales stocks utilizados con su número en la colección del laboratorio, su lugar de origen (si es diferente de la colección del laboratorio) y un artículo de referencia (si existe) entre paréntesis (Para más detalles de cada uno, ver Resultados).

### Stocks de PI3K, GSK3, AKT y Gal4

- *(y)w; UAS – PI3K* (Forma nativa de PI3K; 12 – 180; Dr. Botas; Leever et al., 1996).
- *yw; UAS – PI3K<sup>DN</sup>* (Dominante negativo de PI3K; 12 -183; Dr. Botas; Leever et al., 1996).
- *w; UAS – GSK3 / CyO* (Forma nativa de GSK3; 12 – 247; Dr. Calleja; Bourouis, 2002).
- *w; UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>* (ARN de interferencia de GSK3; 12 – 454; VDRC: 101538KK).
- *w; UAS – AKT* (Forma nativa de AKT; 13 – 462; Radimerski et al., 2002).
- *w; AKT<sup>04226</sup>/TM6, Tb* (Mutante hipomorfo de AKT; 3–142; BL–11627; Martín–Peña et al., 2006).
- *w; tubGal4 – LL7/TM6, Tb* (Expresión del Gal4 en todas las células; 13 – 343; BL – 5138).
- *yw; Sco / CyO; tub.Gal4 – LL7/ MKRS* (Expresión en todas las células; 123 – 130).
- *w; D42 – Gal4* (Expresión en motoneuronas larvarias; 13–392; Dr. Atwood; Parkes et al., 1998).
- *w; OK6 – Gal4* (Expresión en motoneuronas larvarias; 12 – 67; Dr. Sigrist; Aberle et al., 2002).
- *w, elav – Gal4<sup>C155</sup>* (Expresión débil en neuronas; 1–372; BL – 458; Lin y Goodman, 1994).
- *w; elav – Gal4/ TM3, Sb, Ser* (Expresión fuerte en neuronas; 13 – 443; BL – 8760).

- *w; Sp/ CyO; Mhc – Gal4* (Expresión en el músculo; 23 – 30; Dr. Ferveur; Schuster et al., 1996).
- *w; Sco/CyO; Gal80<sup>ts</sup>* (Represor termosensible del Gal4; 123–58; Dr. Davis; McGuire et al., 2003).

### Otros elementos de la vía de PI3K

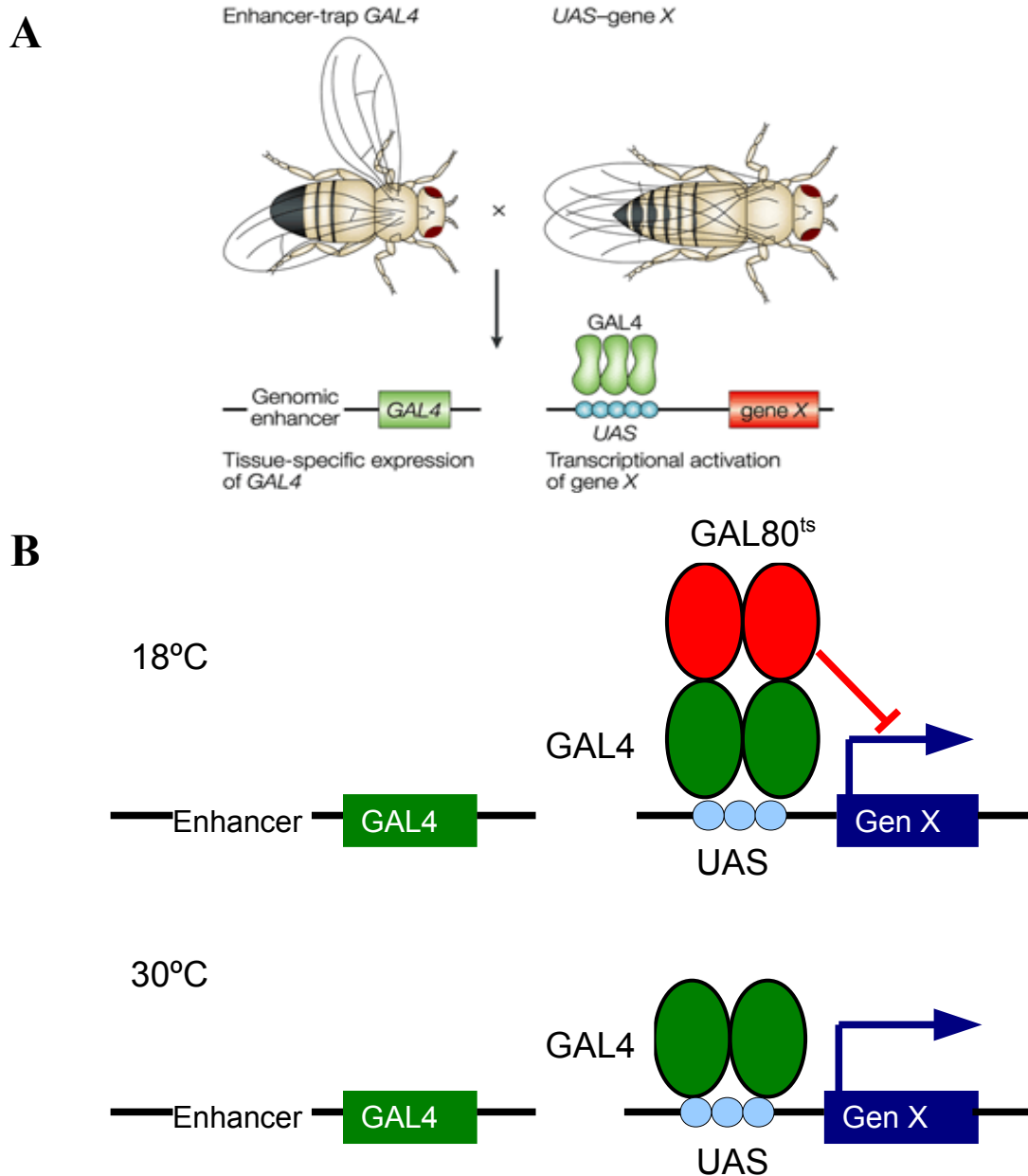
- *w; UAS – wit* (Forma nativa de Wishful thinking; 12 – 376; Dr. Marqués; Marqués et al., 2002 ).
- *bw; wit<sup>A12</sup>/TM6,Tb* y *bw; wit<sup>B11</sup>/TM6,Tb* (Mutantes de Wit; 23 – 35 y 23 – 36; Dr. Marqués; Marqués et al., 2002).
- *w; UAS – hiw* (Forma nativa de Highwire; 12 – 362; Dr. Marqués; Wu et al., 2005).
- *w; hiw<sup>ND8</sup>* (Mutante de Hiw; 1 – 512; Dr. DiAntonio; Wan et al., 2000).
- *yw; UAS – hiw<sup>AE3</sup>/TM6B* (Dominio ubiquitina ligasa delecionado; 13 – 378; Dr. DiAntonio; Wu et al., 2005).
- *w; UAS – gbb* (Forma nativa de Glass bottom boat; 12 – 529; Dr. Marqués; Khalsa et al., 1998).
- *yw; gbb<sup>1</sup>/CyO, GMR>YFP* y *yw; gbb<sup>2</sup>/CyO, GMR> YFP* (Mutantes nulos de gbb; 12 – 555 y 12 – 556; Dr. Marques; Wharton et al., 1999).
- *w; UAS – wnd/CyO* (Forma nativa de Wallenda; 12 – 525; Dr. DiAntonio; Collins et al., 2006).
- *w; UAS – bsk* (Forma nativa de Basket; 12 – 380; BL – 9310; Riesgo – Escovar et al., 1996).
- *yw; UAS – Fos* (Forma nativa de Fos; 12 – 414; BL – 7213; Etter et al., 2005).
- *yw; UAS – Fos<sup>DN</sup>* (Dominante negativo de Fos; 12 – 413; BL – 7214; Collins et al., 2006).
- *yw; UAS – Jun* (Forma nativa de Jun; 13 – 621; BL – 7216; Etter et al., 2005).
- *w; UAS – Jun<sup>DN</sup>* (Dominante negativo de Jun; 12 – 415; BL – 7217; Collins et al., 2006).

## Estudio de las proteínas postsinápticas

- *GluRIIA<sup>RFP</sup>* (RFP=Proteína Roja Fluorescente) y *GluRIIA<sup>GFP</sup>* (GFP=Proteína Verde Fluorescente) (Formas marcadas con fluoróforos de la subunidad A del receptor de glutamato; 13 – 577 y 123 – 187; Dr. Sigrist; Rasse et al., 2005).
- *w; UAS – GluRIIA<sup>ARNi</sup>* (ARN de interferencia de GluRIIA; 12 – 458; VDRC: 101686KK).
- *w; UAS – Dlg<sup>ARNi</sup>* (ARN de interferencia de Disc large; 12 – 453; VDRC:109274KK).

## 2. SISTEMA UAS/GAL4.

Este sistema binario, permite controlar de forma espacial y temporal la expresión de genes, e inducir la expresión de un gen de interés en el tejido y momento del desarrollo deseado. El Gal4 es un factor de transcripción de levaduras que está insertado al azar en el genoma de *Drosophila* y el UAS es la región promotora de reconocimiento a la que se une el Gal4 (Brand & Perrimon, 1993). Las secuencias UAS están unidas al gen que nos interesa expresar. De forma que si se cruza una línea Gal4 con expresión en el sistema nervioso por otra estirpe que tiene el UAS unido al gen de interés, en la descendencia, dicho gen se expresará en el sistema nervioso (**Figura M1A**). Un tercer elemento de este sistema es el Gal80<sup>ts</sup> que reprime el Gal4 uniéndose a éste, y que es sensible a temperatura. De esta forma, a 18°C el Gal80<sup>ts</sup> está activo reprimiendo el Gal4 e impidiendo la expresión del gen de interés al evitar la unión del factor de transcripción Gal4 a su secuencia de reconocimiento. Al cambiar la temperatura a 30°C, el Gal80<sup>ts</sup> se inactiva permitiendo la expresión del gen de interés (McGuire et al, 2003) (**Figura M1B**). En los experimentos en los que se ha empleado el Gal80<sup>ts</sup>, las larvas control (*D42-Gal4*) y experimentales (*D42-Gal4>UAS-PI3K*) fueron mantenidas a 18°C durante todo el desarrollo. En larvas de tercer estadio, la temperatura fue cambiada a 30°C permitiendo la activación del Gal4 y la consiguiente expresión de PI3K.



**Figura M1. Sistema UAS/GAL4.** **A)** Las estirpes que tienen el factores de transcripción GAL4 tienen expresión tejido-específica dependiendo del regulador genómico junto al que se inserten. Por otro lado, las líneas con el gen de interés (gen X) tienen unidas las secuencias de unión del GAL4 (UAS). Al cruzar ambos stocks, el gen X se expresa en un tejido en concreto y momento del desarrollo concreto (por ejem.: el sistema nervioso larvario). **B)** El represor Gal80ts se une al GAL4 a 18°C inhibiéndolo y, por tanto, impidiendo la expresión del gen X. Al cambiar la temperatura a 30°C, el Gal80ts se inactiva. El GAL4 puede unirse a las secuencias UAS permitiendo la expresión del gen X.

### 3. MUTAGÉNESIS CON EMS.

El etilmetanosulfonato (EMS) es un agente alquilante que produce mutaciones puntuales,

pequeñas deleciones y, ocasionalmente, reordenamientos. El protocolo empleado es el siguiente: Se recuperan grupos de 60 machos (*yw*; *UAS –PI3K* recién eclosionados) y se les deja sin comida ni agua 2 – 3 horas. Seguidamente, se colocan en botellas que contienen únicamente un papel impregnado con 5ml de una solución azucarada con 13 µl. de EMS (0,025M) y se les deja toda la noche. Al día siguiente los machos se pasan a una botella con medio y son cruzados por hembras *yw*; *Sco/CyO*; *LL7 – Gal4/MKRS*. En la descendencia, se observa si hay individuos *LL7 – Gal4>UAS – PI3K* indicando un rescate del fenotipo letal (supresión de la letalidad). Se han buscado supresores por el criterio de la posible supresión de la letalidad, causada por la expresión generalizada de PI3K.

## 4. INMUNOHISTOQUÍMICA.

### 4.1. Número de sinapsis.

El número de sinapsis se cuantificó en motoneuronas de tercer estadio larvario mediante el uso de los anticuerpos primarios nc82 o Brp, generados contra su región C – terminal y N – terminal de la proteína Bruchpilot, respectivamente. Ésta es un componente de la estructura en forma de T característica de las zonas activas de *Drosophila* (Wagh et al, 2006; Fouquet et al, 2009; Oswald et al, 2010). Para visualizar la membrana de las motoneuronas se utiliza un  $\alpha$  – HRP que se une a la glicoproteína Nervana de la membrana neuronal (Wang et al, 1994 y Sun & Salvaterra, 1995). El protocolo de inmunomarcaje es el siguiente:

- Se recogen larvas de tercer estadio.
- Cada larva se coloca en una gota de PBS sobre una placa de silgar (*Rhodorsil Silicones*) y se fija con agujas de tungsteno afiladas por electrolisis.
- Tiempo de fijación: 10 – 20 min. en paraformaldehído o formaldehído al 4% en una solución de 0,1 % de Triton X – 100 en PBS (PBT).
- Se disecan y limpian en 0,05% de Triton X – 100 en PBS eliminando todos los órganos internos y la grasa, dejando la pared muscular y el sistema nervioso.
- Lavados: 3x5min. en PBT.
- Bloqueo 30 min. – 1h a temperatura ambiente (RT) con agitación suave [5% NGS (Suero

normal de cabra) en PBT].

- Incubación con los anticuerpos primarios  $\alpha$  – HRP generado en conejo (1/200, #323005021, *Jackson ImmunoResearch*) y el anticuerpo  $\alpha$ 82 (1/10, DSHB) de ratón en solución de bloqueo toda la noche a 4° C con agitación suave.
- Lavados: 6 x 15 min. En PBT con agitación suave a RT.
- Incubación con los anticuerpos secundarios durante 2 – 4h RT con agitación suave. Alexa Fluor 568 de cabra contra conejo IgG (H+L) (A11011, *Invitrogen*) y Alexa Fluor 488 de cabra contra ratón IgG (A11001, *Invitrogen*); ambos diluidos en PBT a 1/500.
- Lavados: 3x15min. en PBT.
- Montaje en el medio de montaje especial para fluorescencia *Vectashield (Molecular Probes)*.

#### 4.2. Número de densidades postsinápticas (PSDs).

La cuantificación del número de PSDs se realiza utilizando anticuerpos contra las diferentes subunidades presentes en la NMJ. Los anticuerpos GluRIIA (1/100, 8B4D2, DSHB) y el GluRIIB (1/2000, Dr. Featherstone, UIC *Biological Science*) fueron generados específicamente contra los receptores de tipo IIA o IIB y los anticuerpos GluRIIC (1/1000, Dr. DiAntonio, *Developmental Biology Department, University of Washington*) y GluRIID (1/500, Dr. Sigrist, *Neurocare, Freie Universität Berlin*) para marcar todos los receptores de glutamato de la NMJ. El protocolo es similar al anterior pero con las siguientes modificaciones: a) Se fija en metanol puro a -20°C en las inmuns de GluRIIA (no funcionan con aldehídos) y b) se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios: un Alexa Fluor 488 obtenido en cabra contra IgG de conejo (1/500, A11070, *Invitrogen*), un anticuerpo fluorescente Cy3 (rojo) generado en cabra contra IgG de ratón (1/500, #115165146, *Jackson ImmunoResearch*) y un anticuerpo fluorescente Cy5 (rojo lejano) acoplado a HRP obtenido en cabra (1/250, #123175021, *Jackson ImmunoResearch*).

### 5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA (WESTERN BLOT).

Los Western Blot (WB) se realizaron a partir de cerebros de larvas de tercer estadio que



expresaban única y específicamente en neuronas bajo el control de la línea *elav – Gal4*, la quinasa PI3K, su forma dominante negativo (PI3K<sup>DN</sup>), la quinasa GSK3 o un ARN de interferencia frente a GSK3 (GSK3<sup>ARNi</sup>). Los cerebros fueron disecados en PBS y congelados a -80°C. A continuación, 11 cerebros de cada genotipo fueron homogeneizados en tampón de lisis (Tris – HCL 50 mM, NaCl 0,3 M, 1% de Tritón X – 100 (*Sigma – Aldrich*), cóctel inhibidor de proteasas *Complete* (*Roche*) e inhibidores de fosfatas [cócteles 1 y 2 (*Sigma – Aldrich*)]. Tras añadir el tampón de carga [(Tris – Glicina SDS *Sample Buffer*, #LC2676, *Invitrogen*) + Mercaptoetanol], las muestras se hirvieron 10 minutos y se cargaron cantidades similares de las proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida al 10% (NP0301, *Invitrogen*) y se sometieron a electroforesis. Para calcular el tamaño relativo de las proteínas se usó el marcador *Precision Plus Protein Standards All Blue* (*Bio – Rad*). La electroforesis y la transferencia de los geles a membrana se realizaron según las instrucciones del fabricante y procedimientos estándar de laboratorio (*Invitrogen*, Ausubel et al, 1991). A continuación, las membranas fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios: anti – AKT 1:1000 (#9272, *Cell Signaling*), anti – AKT – P 1:1000 (#4054, *Cell Signaling*), anti – GSK3 1:1000 (#05-412, *Millipore*), anti-Dlg 1:1250 (#4F3, DSHB), anti-GluRIIA 1:1000 (Forma concentrada, DSHB), anti – tubulina 1:5000 (#T9026, *Sigma – Aldrich*) con 3% de leche en polvo (*Bio – Rad*) en PBST (PBS + 0,05% Tween 20, *Sigma – Aldrich*) toda la noche a 4°C. Se lavaron con agua destilada de forma rápida dos veces y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa generados en cabra contra IgG de conejo (1:5000, #A0545, *Sigma – Aldrich*) y contra IgG ratón (1:5000, #A9044, *Sigma – Aldrich*) durante 1,5 horas a RT en PBST. Las membranas fueron lavadas con PBST (2x10 min.) y reveladas con *SuperSignal* (*Thermo Scientific*). Las bandas del WB fueron escaneadas y cuantificadas utilizando el densitómetro GS800 y el programa *Quantity One* (*Bio – Rad*). En todos los casos, las cantidades relativas de proteína fueron normalizadas respecto a la tubulina.

## 6. PCR CUANTITATIVA.

### Extracción de ARN

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de larvas de tercer estadio. Los genotipos utilizados fueron larvas control (*elav – Gal4*), larvas que sobreexpresaban PI3K mediante el Gal4 neuronal *elav* (*elav – Gal4 > UAS – PI3K*) y larvas sobreexpresando el dominante negativo de PI3K

(*elav – Gal4 > UAS – PI3K<sup>DN</sup>*). Para cada muestra, se congelaron 7 larvas a -80°C. Se realizó el siguiente protocolo de extracción:

- Se añaden 250 µl. de TRIZOL (*Invitrogen*) a cada muestra. Se homogenizan y se añaden otros 250 µl. de TRIZOL.
- 100 µl. de cloroformo (1/5 del volumen inicial). Agitar 15 seg. y dejar reposar 2 min. a RT.
- Centrifugación a 4°C 15 min. a 12000 rpm.
- Se forman 2 fases. Se extrae la parte superior que contienen el ARN a otro tubo.
- Añadir 250 µl. (1/2 del volumen inicial) de isopropanol.
- Mezclar y dejar reposar 10 min. a RT.
- Se centrifuga de nuevo a 4°C 15 min.
- Retirar el sobrenadante y se añade un volumen igual al inicial (500 µl.) de etanol al 70%.
- Centrifugación a 4°C 5 min. a 7000 rpm.
- Se retira el etanol y se deja secar el pellet.
- Se resuspende en aprox. unos 40 µl. Se calienta a 37°C para facilitar la resuspensión.
- Se guarda a -80°C.

Para comprobar que el ARN había sido extraído correctamente y que no había degradación de las muestras se corrió un gel al 1% de agarosa con un 1 µl. de ARN de cada una de las muestras.

## RT – PCR

Con el fin de pasar el ARNm a ADNc, se midieron las cantidades de ARN de cada una de las muestras. Para ello, se utilizó el espectrofotómetro *NanoDrop*. Seguidamente, se realizó la retrotranscripción (RT) partiendo de 5 µg. de ARNm de cada muestra. Utilizamos la *SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

## PCR cuantitativa a tiempo real (QPCR)

Hemos analizado los niveles de expresión de diferentes genes relacionados con las sinapsis mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Del lado presináptico, se ha estudiado la expresión de

Liprin, Sinaptobrevina, Bruchpilot y Wingless. Del lado postsináptico, hemos analizado la expresión de los receptores de glutamato de tipo GluRIIA y GluRIIB así como la transcripción general de dichos receptores (GluRIID). La cuantificación de estos genes se realizó utilizando sondas *Taqman* (*Applied Biosystems*). Cada sonda es específica del gen e incluye también dos cebadores específicos (ver **Tabla M1**). El protocolo se realizó según las instrucciones del fabricante utilizando además de las diferentes sondas el *Master Mix* del mismo fabricante (#4369016, *Applied Biosystems*). Todas las reacciones se realizaron por triplicado, teniendo además, un mínimo de tres muestras diferentes por genotipo. Para poder cuantificar la cantidad de transcrito cada gen, en cada experimento se incluía una curva estándar de muestras de individuos control (*elav – Gal4*) diluidas de forma seriada (Curva estándar de 4 puntos). Las reacciones se realizaron en el termociclador modelo 7500 de *Applied Biosystems* usando las siguientes condiciones: 10 min 95°C, 40 ciclos: 15 seg. 95°C y 30 seg. 60°C. Posteriormente, los datos fueron normalizados respecto a la ARN polimerasa II y analizados con el programa 7500 (*Applied Biosystems*).

**Tabla M1.** Secuencias de hibridación de las sondas utilizadas para las QPCRs de cada uno de los genes analizados.

Gen	Localización	Secuencia de hibridación
ARN polimerasa II	-----	CAAAGCGCTATGGGTAAGCAAGCTA
Liprin	Presináptica	GACTGAATATGCCGACTACTCGTGG
Bruchpilot	Presináptica	AGCACGGAGAACCAGAAACAAGCTA
Wingless	Presináptica	GGGGCTCCATGTGGTGGGGCATTGC
Sinaptobrevina	Presináptica	CGTTCTGGTGTGCTTTTCAATTGA
GluRIIA	Postsináptica	AAGTTCAAAGGCAGCCAGTGATATT
GluRIIB	Postsináptica	AAGGAGAAGATTCCACCCATGCTGG
GluRIID	Postsináptica	TGTAGGCTAATGCAGAGTGGAGTGG

## 7. FLUORESCENCE RECOVERY AFTER PHOTBLEACHING.

Estos experimentos se realizaron según lo publicado anteriormente (Füger et al., 2007; Rasse et al., 2005; Jordán – Álvarez et al., 2012). Brevemente, utilizamos un stock con la subunidad endógena GluRIIA marcada con las proteínas fluorescentes RFP (GluRIIA<sup>mRFP</sup>) y GFP (GluRIIA<sup>GFP</sup>)

en larvas control (*OK6 – Gal4*) y larvas experimentales (*OK6 – Gal4>UAS – PI3K*). Las larvas estaban anestesiadas con Desfluorano (*Baxter*) durante la adquisición de imágenes para impedir los movimientos internos de la pared larvaria. Las series de imágenes fueron tomadas cada 0.5  $\mu\text{m}$  con el objetivo 63X (512x512 píxeles, 50x50  $\mu\text{m}$ ) en la NMJ de los músculos 26 – 27 del segmento A3 de larvas de tercer estadio. Se empleó un microscopio confocal de Leica del modelo TCS SP5 II. Para tomar las imágenes en tres momentos diferentes para su posterior análisis: antes del fotoblanqueo, 0 horas después del fotoblanqueo y 14 horas después del fotoblanqueo. Únicamente el canal rojo fue fotoblanqueado (excitado con el láser DPSS 561 nm Lasos YLK6110T) dejando el canal verde (excitado utilizando el láser 488 nm ArKr Lasos LGK 7872 ML05) como referencia interna. Después de la anestesia y la adquisición de las dos primeras series de imágenes, las larvas fueron depositadas en una placa que contenía un sustrato compuesto por zumo de manzana, agar, azúcar y levadura para que pudieran continuar su desarrollo de forma normal. 14 horas más tarde, se tomó la última imagen para observar la recuperación de la señal del canal rojo (*GluRIIA<sup>mRFP</sup>*). La recuperación fue calculada como la diferencia (%) entre el valor de la intensidad en la región blanqueada respecto a la intensidad en las áreas no afectadas que la rodeaban, permitiendo cuantificar la incorporación de GluRII en la NMJ. Se analizaron un mínimo de 7 larvas por genotipo.

## 8. MICROSCOPIA CONFOCAL.

Una vez finalizados los experimentos de inmunohistoquímica, se tomaron secciones ópticas de las diferentes muestras. Para cuantificar el número de sinapsis y densidades postsinápticas, conjuntos de imágenes seriadas fueron adquiridas en los músculos 6/7 (segmento A3) de larvas de tercer estadio, controles y experimentales, usando para ello un microscopio confocal Leica TCS SP5 II. Se utilizaron los mismos láseres que en los experimentos de FRAP (ver sección anterior) así como el láser rojo lejano (HeNe 633 nm Lasos LGK 7654). Las series de imágenes se tomaron a 1024x512 píxeles (100x50  $\mu\text{m}$ ) o 1024x1024 píxeles (100x100  $\mu\text{m}$ ) cada 0.5  $\mu\text{m}$  con el objetivo 63X. Entre 8 – 12 larvas fueron analizadas por cada genotipo.

## 9. ANÁLISIS DE IMAGEN.

### Cuantificación del número de sinapsis

Las imágenes tomadas en el confocal fueron analizadas para contar el número de sinapsis (puntos inmunoreactivos para nc82) por NMJ. Se han utilizado para contar sinapsis los programas *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>; versión 1.44) e *Imaris* (*Bitplane*; versión 6.3.1). En *ImageJ*, se utilizó el plugin *Point Picker* (<http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/pointpicker/>) que permite marcar los puntos individuales manualmente y obtener el número total de sinapsis (Jordán – Álvarez et al., 2012). Por otra parte, en el programa *Imaris*, se empleó la función *Spots* que cuantifica, de forma automática, el número total de puntos en el canal deseado (en este caso el verde) a partir del umbral elegido (0.200  $\mu\text{m}$ , tamaño medio de los puntos). Los resultados obtenidos con ambos programas son similares.

### Cuantificación del número de densidades postinápticas (PSDs)

Las imágenes obtenidas de las preparaciones larvarias teñidas contra anticuerpos de las diferentes subunidades de receptores de glutamato (GluRII) así como las de los experimentos de FRAP fueron analizadas para obtener el número total de PSDs por NMJ. Se empleó la función *Analyze Particles* del programa *ImageJ* siguiendo la metodología previamente descrita (Rasse et al., 2005; Schmid, 2006; Jordán – Álvarez et al., 2012). En resumen, las PSDs son individualizadas de manera manual para su análisis y, posteriormente, el programa indica automáticamente el número total, tamaño e intensidad media de las PSDs.

## 10. ESTADÍSTICA.

Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas usando el test de *Student* de dos colas o el análisis

de la varianza (ANOVA) para datos que seguían una distribución normal. El test *Kolmogorov – Smirnov* fue utilizado para comprobar la normalidad de los datos antes de aplicar los otros análisis estadísticos. Se empleó el programa *GraphPad InStat 3* para dichos tests. Las diferencias significativas frente al control están indicadas como \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.0005$ .

## **RESULTADOS**





## 1. BÚSQUEDA DE GENES QUE INTERACTÚAN CON PI3K O GSK3.

Se ha utilizado un procedimiento genético para buscar esas posibles interacciones, basado en el aislamiento de mutantes supresores del efecto letal causado por la hiperexpresión generalizada de PI3K o GSK3. Como primer paso, se ha analizado la letalidad de PI3K y GSK3 bajo el control de diferentes Gal4 (**Tabla R1**).

**Tabla R1.** Análisis de la letalidad de PI3K y GSK3 en el individuo entero (*LL7 – Gal4*, *armadillo – Gal4* y *daughterless – Gal4*) o en el sistema nervioso (*elav – Gal4* y *nrv2 – Gal4*). N>100 en todos los casos.

Líneas UAS	Gal4 empleado	Fenotipo
<i>yw; UAS – PI3K</i>	<i>w; tub.Gal4 – LL7/TM3,Sb Ser</i>	Letal embrionario
	<i>w; daughterless – Gal4</i>	
	<i>w; armadillo – Gal4</i>	
	<i>w, elavGal4<sup>C155</sup></i>	Viable
	<i>w; elavGal4 /TM3</i>	Viable (41 % <i>elav – Gal4</i> > <i>UAS – PI3K</i> )
	<i>w; nrv2 – Gal4; nrv2 – Gal4</i>	Viable
<i>yw; UAS – PI3K<sup>DN</sup></i>	<i>w; tubGal4 – LL7/TM3,Sb Ser</i>	Viable (18% <i>LL7 – Gal4</i> > <i>UAS – PI3K<sup>DN</sup></i> )
	<i>w, elavGal4<sup>C155</sup></i>	Viable
	<i>w; elavGal4 /TM3</i>	Viable
<i>w; UAS – GSK3</i>	<i>w; tubGal4 – LL7/TM3,Sb Ser</i>	Letal embrionario
	<i>w, elavGal4<sup>C155</sup></i>	Viable
	<i>w; elavGal4 /TM3</i>	Viable
<i>w; UAS – GSK3<sup>DN</sup></i>	<i>w; tubGal4 – LL7/TM3,Sb Ser</i>	Letal embrionario
	<i>w, elavGal4<sup>C155</sup></i>	Viable
	<i>w; elavGal4 /TM3</i>	Viable
<i>w; UAS – PI3K<sup>ARNi</sup></i>	<i>w; tub.Gal4 – LL7/TM3,Sb Ser</i>	Letal embrionario
	<i>w, elavGal4<sup>C155</sup></i>	Viable
	<i>w; elavGal4 /TM3</i>	Viable

Como puede observarse en la **tabla R1**, la sobreexpresión de PI3K en todo el individuo mediante el uso de Gal4 (*LL7 – Gal4 >UAS – PI3K*; *armadillo – Gal4 > UAS – PI3K* y *daughterless – Gal4 > UAS – PI3K*) es letal. En cambio, si se expresa en el sistema nervioso (*elav – Gal4 > UAS – PI3K*) es viable sólo en el 41% de los individuos. Sin embargo, la sobreexpresión de su dominante negativo (PI3K<sup>DN</sup>) es viable en todos los casos. Por su parte, GSK3 es letal cuando se sobreexpresa en todo el individuo (*LL7 – Gal4 > UAS – GSK3*) y también cuando se expresa un dominante negativo (GSK3<sup>DN</sup>) con el mismo Gal4.

Una vez observado que sólo la expresión de PI3K en todo el individuo es letal, se realizó un rastreo en genomas mutagenizados por EMS utilizando el *LL7 – Gal4* (ver Materiales y Métodos). En un caso, apareció una supresión de la letalidad que se comprobó que era un falso positivo ya que se había delecionado el transgén *UAS – PI3K*. Fueron analizados aproximadamente unos 15000 genomas sin que se aislase ningún caso de supresor viable y fértil. Así pues, inferimos que los hipotéticos mutantes supresores del efecto debido a la hiperexpresión de PI3K, o bien no son posibles o bien se trata de mutantes inviables.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA SINAPTOGÉNICA.

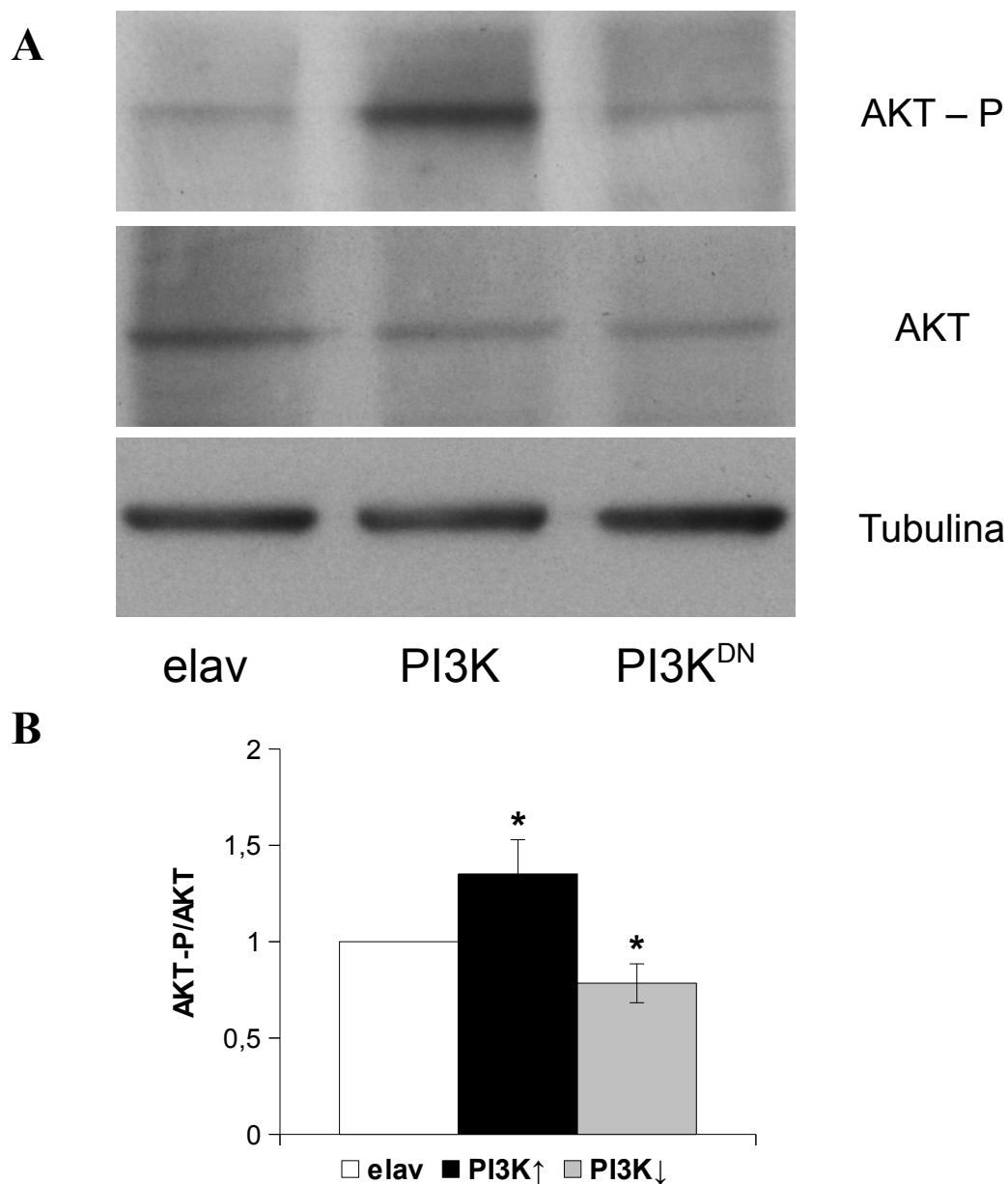
### 2.1. PI3K, AKT Y GSK3 FORMAN PARTE DE UNA MISMA RUTA.

Hemos analizado si estas tres quinasas constituyen parte de una misma vía de señalización sinaptogénica y, en su caso, saber cuál es su orden jerárquico. Como estrategias experimentales, se adoptó un análisis de epistasia y una detección y cuantificación de los niveles de proteína por Western Blot (WB).

#### 2.1.1. PI3K activa a AKT.

Martín – Peña et al, 2006 demostraron que PI3K jugaba un papel importante en la formación de sinapsis. Además de ésta, las quinasas AKT y GSK3 también tienen un papel en la sinaptogénesis. Por ello, decidimos estudiar si estas tres proteínas formaban parte de una misma vía sinaptogénica o, por el contrario, sus efectos eran independientes.

Se ha demostrado que PI3K fosforila y activa AKT en múltiples rutas metabólicas (revisado en Cantley, 2002; Vanhaesebroeck et al., 2012). Debido a ello, analizamos mediante Western blot (WB) si el aumento del número de sinapsis dependientes de PI3K necesitaba la activación de AKT. Se utilizaron extractos de cerebros de larvas de tercer estadio (LIII) en los que se sobreexpresaba la forma nativa PI3K (*elav – Gal4 > UAS – PI3K*) o un dominante negativo de esta proteína (*elav – Gal4 > UAS – PI3K<sup>DN</sup>*) en el cual está mutado el dominio de unión a ATP (Leevers et al, 1996) (**Fig. R1A**). Se emplearon anticuerpos primarios específicos frente a AKT y su forma fosforilada (AKT – P) para cuantificar por densitometría la cantidad relativa de ambas proteínas. En ambos casos, la cantidad se normalizó con respecto a la tubulina. Los datos muestran que cuando se sobreexpresa PI3K aumenta la cantidad de AKT – P y que ésta disminuye en consecuencia cuando se emplea PI3K<sup>DN</sup> (**Fig. R1B**). **Estos resultados indican que, para su función sinaptogénica, PI3K depende de la activación de AKT lo que constituye una fuerte evidencia de que las dos quinasas forman parte de una misma vía sinaptogénica.**



**Figura R1. Cantidad de relativa de AKT – P/AKT en larvas que sobreexpresan PI3K o que expresan un dominante negativo de esa quinasa (PI3K<sup>DN</sup>). A)** Western Blot utilizando los anticuerpos frente a AKT y AKT – P en cerebros de larvas de tercer estadio. **B)** Cuantificación de ambas proteínas en controles (*elav – Gal4*), animales sobreexpresando PI3K (*elav – Gal4>UAS – PI3K*) y el dominante negativo de PI3K (*elav – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*). Las cantidades de AKT – P y AKT están normalizados respecto a la tubulina en todos los genotipos. \* $p < 0,05$  respecto del control.

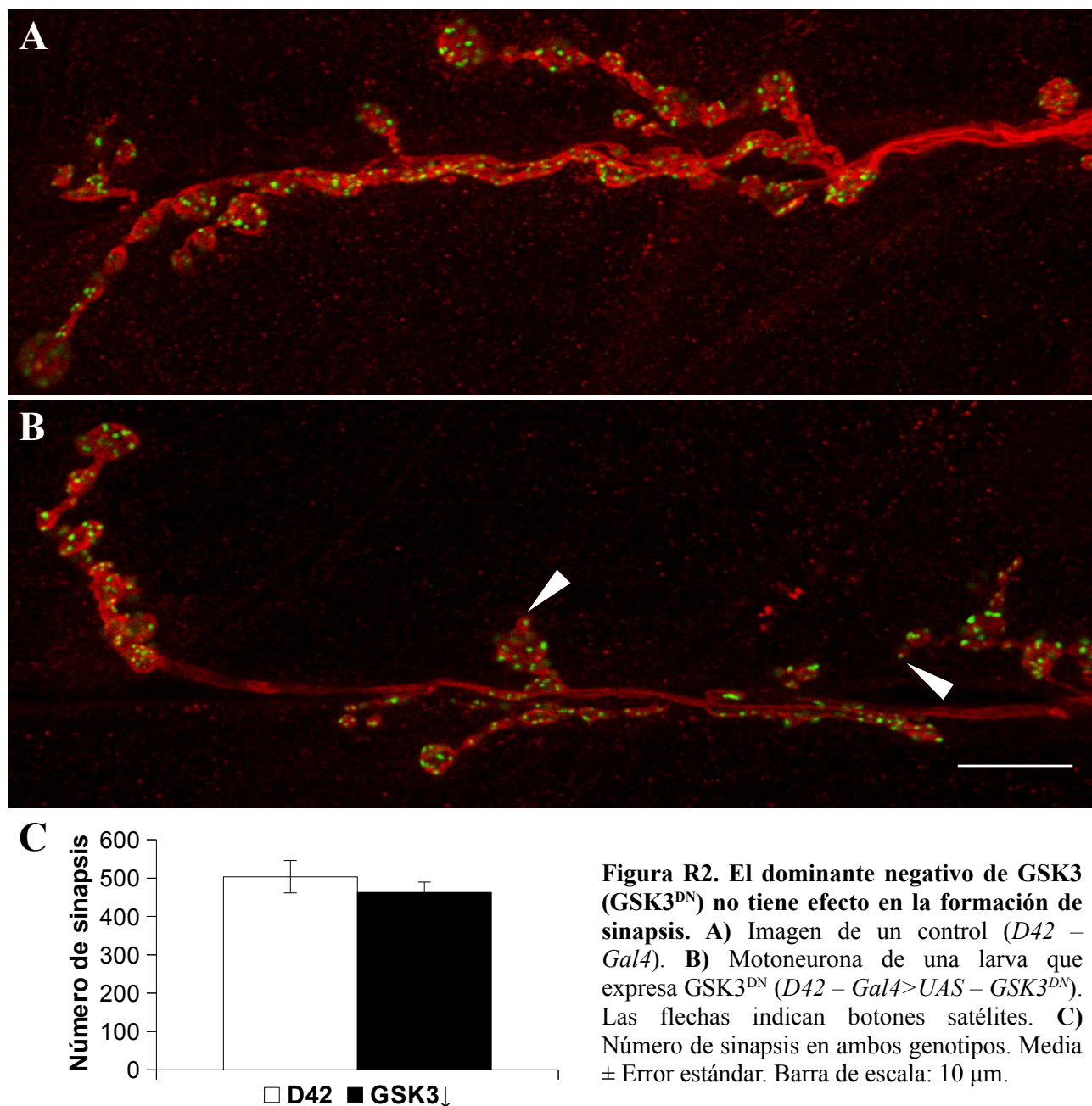
### 2.1.2. Relación entre PI3K y GSK3 en la sinaptogénesis.

Dado que PI3K y GSK3 tienen efectos sinaptogénicos y antisinaptogénicos respectivamente decidimos estudiar si ambas proteínas formaban parte de una misma ruta o no. Martín – Peña et al,

2006 demostró que la subida de GSK3 daba lugar a una bajada en el número de sinapsis. Por ello, en primer lugar, estudiamos si la disminución de GSK3 ejercía el efecto contrario, es decir, un incremento en la sinaptogénesis. Primero se empleó un dominante negativo de esta proteína (*UAS – GSK3<sup>DN</sup>*, Franco et al., 2004) en la unión neuromuscular larvaria (NMJ), en las fibras musculares 6/7 y se cuantificó el número de sinapsis utilizando el anticuerpos nc82 (Wagh et al, 2006) a la vez que se visualizaba la membrana de la motoneurona con anti – HRP (Jan y Jan, 1982; **Fig. R2A – B**). Nuestros datos indican que no existen diferencias en el número de sinapsis entre los controles (*D42 – Gal4*) y los experimentales (*D42 – Gal4 > UAS – GSK3<sup>DN</sup>*) (**Fig. R2C**). Sin embargo, sí se aprecian más botones satélite en los individuos *GSK3<sup>DN</sup>* (Flechas en la **Fig. R2B**) como ya se había descrito previamente (Franco et al, 2004). Es decir, el dominante negativo da lugar a un fenotipo morfológico en la motoneurona, sin afectar el número de sinapsis. En una segunda tanda de experimentos estudiamos la falta de función de GSK3 mediante un ARNi (*UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>*) analizando por WB si este ARNi bajaba la cantidad de GSK3 en extractos de cerebros larvarios (**Fig. R3A**). Para detectar GSK3, se empleó un anticuerpo que reconoce dos de las isoformas de la proteína, SGG10 y SGG39. Los niveles de ambas fueron normalizados posteriormente respecto a Tubulina. En la **Fig. R3B – C**, se muestra que la cantidad de ambas isoformas disminuye cuando se expresa el ARNi (*elav – Gal4 > UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>*; SGG10:  $0,58 \pm 0,08$ ; SGG39:  $0,50 \pm 0,04$ ; n= 3 en ambos casos) frente al control (*elav – Gal4*). Por otro lado, la sobreexpresión de GSK3 (*elav – Gal4 > UAS – GSK3*) da lugar a 3 veces más proteína de la isoforma SGG10 que el control ( $3,16 \pm 0,36$  n=3; **Fig. R3B**) mientras que apenas aumenta la isoforma SGG39 ( $1,13 \pm 0,03$  n=3; **Fig. R3C**). Esta selectividad de isoforma es debida a que el transgen *UAS – GSK3* se construyó con el ADNc de la isoforma SGG10 (Bourouis, 2002). Una vez demostrado que el *GSK3<sup>ARNi</sup>* es funcional, se expresó en la NMJ (*D42 – Gal4 > UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>*). Los datos muestran que el número de sinapsis aumenta ( $835 \pm 37$ , n=7) significativamente respecto del control (*D42 – Gal4*;  $528 \pm 35$ , n=9,  $p < 0,0001$ ; **Fig. R4A – B, D**), indicando, por tanto que GSK3 regula la sinaptogénesis.

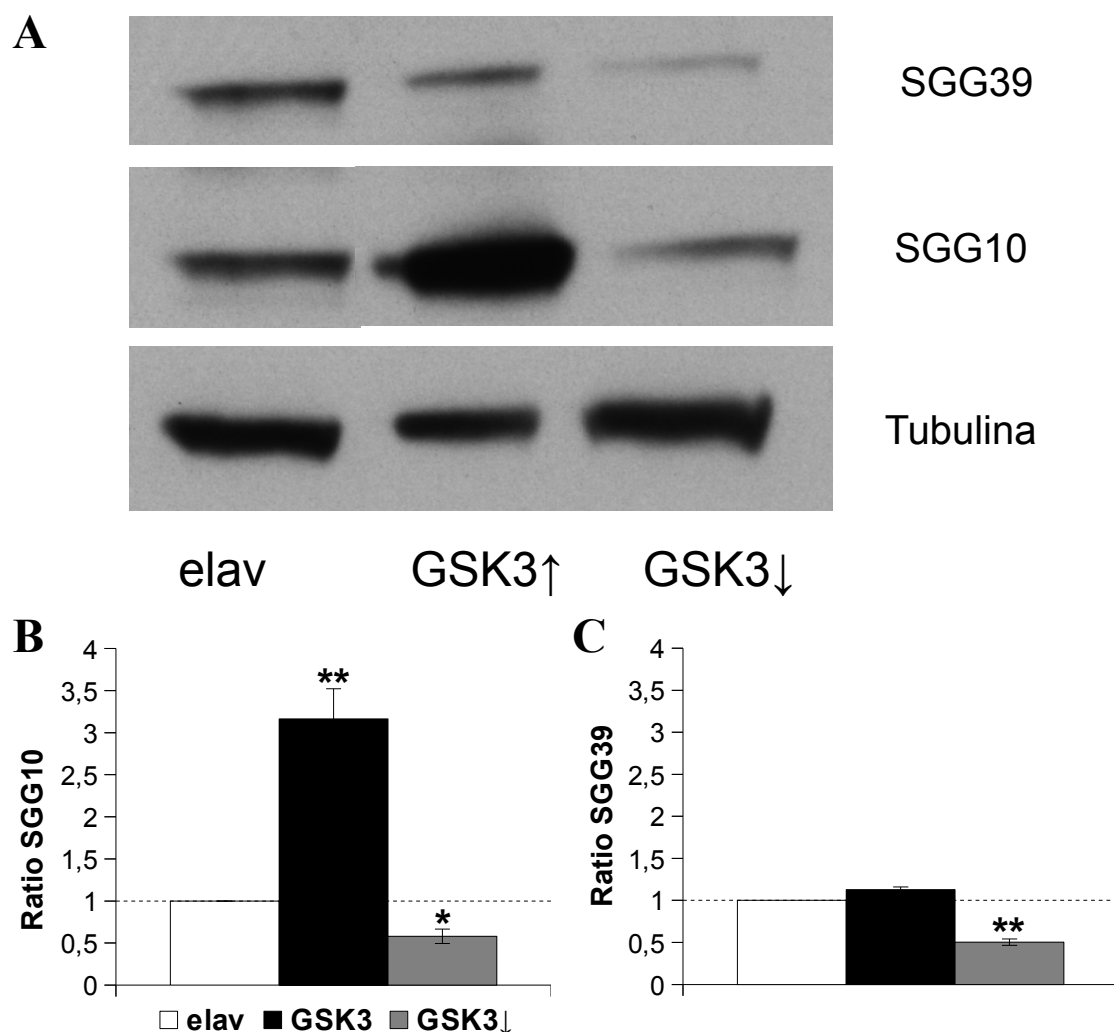
A continuación, se estudió la posible interacción de PI3K y GSK3 mediante análisis de epistasia. Como se ha mencionado, la sobreexpresión de PI3K en la NMJ aumenta el número de sinapsis (*D42 – Gal4 > UAS – PI3K*,  $745 \pm 33$ , n=8;  $p < 0,0001$ ) y la sobreexpresión de GSK3 lo disminuye (*D42 – Gal4 > UAS – GSK3*,  $417 \pm 18$ , n=13;  $p = 0,0026$ ). Si se combinan ambos predomina el efecto de GSK3 (*D42 – Gal4 > UAS – PI3K/UAS – GSK3*,  $411 \pm 23$ , n=8;  $p = 0,0037$ ; **Fig. R4A, C**). Además, si se expresa al mismo tiempo GSK3 con el dominante negativo de *PI3K<sup>DN</sup>*

sus efectos antisinaptogénicos no se suman ( $D42 - Gal4 > UAS - PI3K^{DN}/UAS - GSK3$ ,  $265 \pm 24$ ,



$n=9$ ;  $p<0,0001$ ; **Fig. R4A**). Estos resultados indican que ambas proteínas estarían en una misma vía. Asimismo, se expresó el  $GSK3^{ARNi}$  conjuntamente con PI3K o  $PI3K^{DN}$ . En el primer caso, el número de sinapsis no aumenta más que cualquiera de ellos expresado por separado ( $D42 - Gal4 > UAS - PI3K/UAS - GSK3^{ARNi}$ ;  $822 \pm 33$ ,  $n=7$ ; **Fig. R4A, F**). En el segundo, el efecto del  $PI3K^{DN}$  disminuyendo el número de sinapsis rescata el fenotipo de  $GSK3^{ARNi}$  ( $D42 - Gal4 > UAS - PI3K^{DN}/UAS - GSK3^{ARNi}$ ,  $355 \pm 40$ ,  $n=7$ ; **Fig. R4A, E**). **En conjunto, estos datos confirman que PI3K y GSK3 formarían parte de una misma vía sinaptogénica aunque no podemos indicar su**

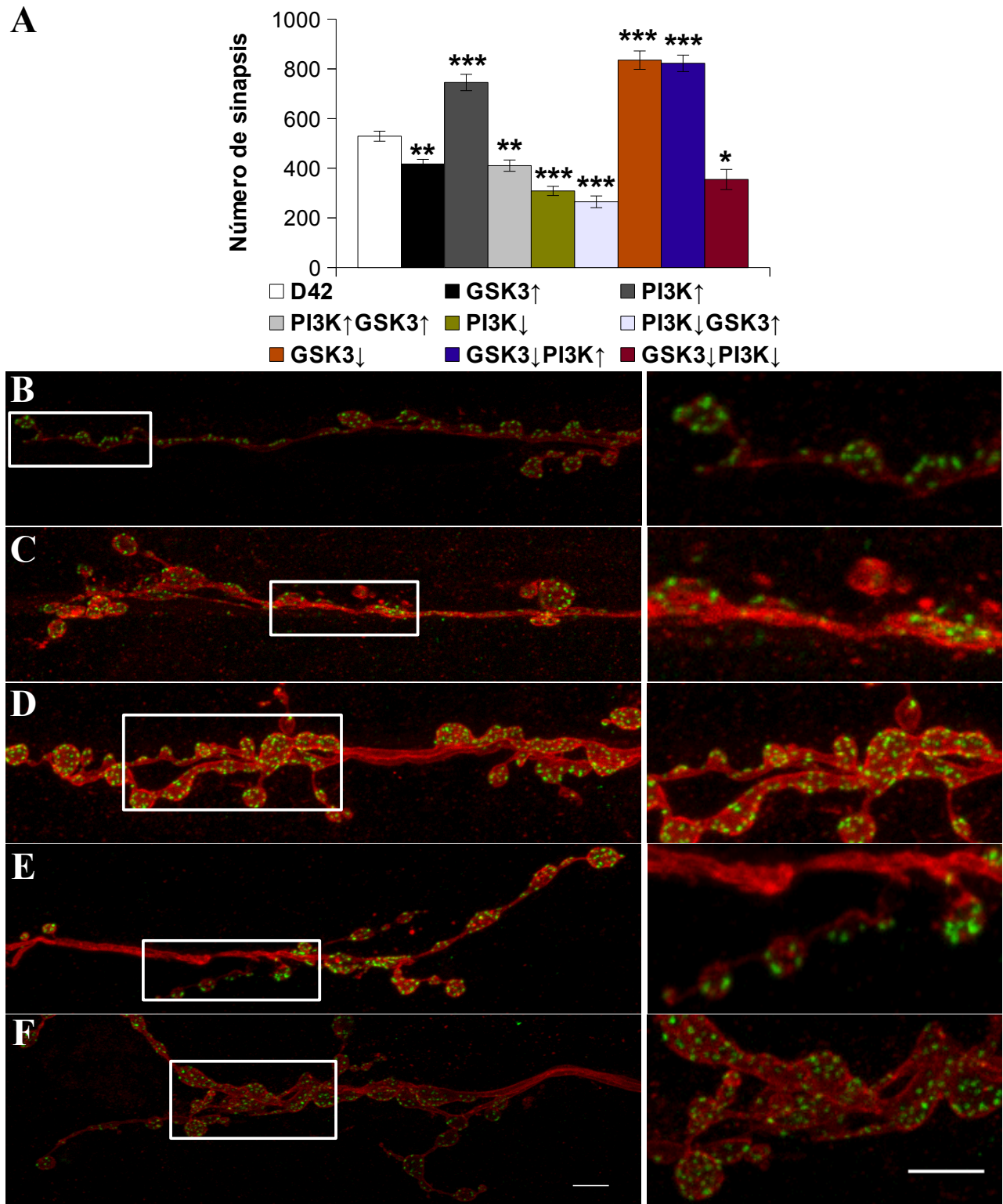
orden jerárquico.



**Figura R3. Cantidad de relativa de las isoformas de GSK3 en diferentes genotipos.** A) Western Blot utilizando el anti – GSK3 en cerebro de larva. Este anticuerpo reconoce dos isoformas SGG39 (primera banda) y SGG10 (banda intermedia). Se muestra también la tubulina (última banda). B) Cuantificación de SGG10 en controles (*elav*), animales sobreexpresando GSK3 (*elav > UAS – GSK3*) y un ARNi contra GSK3 (*elav > UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>*). La cantidad de GSK3 está normalizado respecto a la tubulina en todos los genotipos. C) Cuantificación de SGG39 en los mismos genotipos.

### 2.1.3. Relación entre AKT y GSK3.

Los resultados anteriores sugieren que PI3K, AKT y GSK3 forman parte de una misma vía de señalización para la formación de sinapsis. Sin embargo, desconocemos el orden jerárquico de estas tres quinasas. Para intentar resolverlo, decidimos expresar de forma simultánea AKT y GSK3 y analizar su efecto sobre el número de sinapsis.

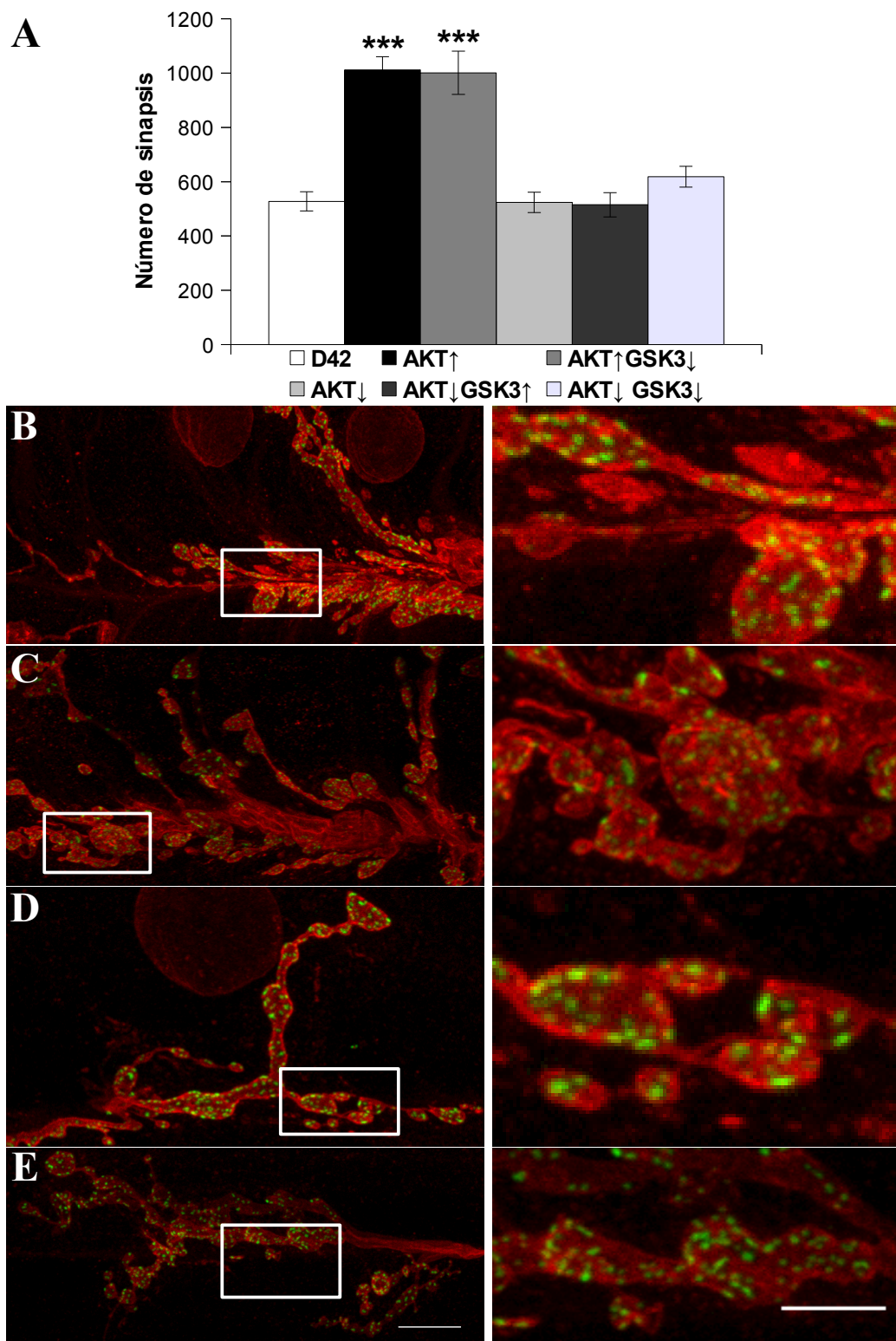


**Figura R4. Número de sinapsis en larvas que expresan PI3K, GSK3 o combinaciones de ambas. A)** Número total de sinapsis en diferentes genotipos. **B)** Control (*D42 -Gal4*). **C)** Sobreexpresión de GSK3 y PI3K a la vez (*D42 - Gal4> UAS - GSK3/UAS - PI3K*). **D)** Bajada de GSK3 (*D42 - Gal4> UAS - GSK3<sup>ARNi</sup>*). **E)** Bajada de GSK3 y PI3K (*D42 - Gal4> UAS - GSK3<sup>ARNi</sup>/ UAS - PI3K<sup>DN</sup>*). **F)** Bajada de GSK3 y sobreexpresión de PI3K (*D42 - Gal4>UAS - GSK3<sup>ARNi</sup>/ UAS - PI3K*). Los genotipos en **A)** no mencionados en **B-D)** son: *D42 - Gal4> UAS - GSK3*; *D42 - Gal4> UAS - PI3K*; *D42 - Gal4> UAS - PI3K<sup>DN</sup>* y *D42 - Gal4>UAS - GSK3<sup>ARNi</sup>/ UAS - PI3K<sup>DN</sup>*. Las fotos de la derecha son magnificaciones de los cuadrados a la izquierda. Rojo:  $\alpha$  - HRP Verde: nc82. Escalas en **F)**: 10 y 5  $\mu$ m. Respectivamente.

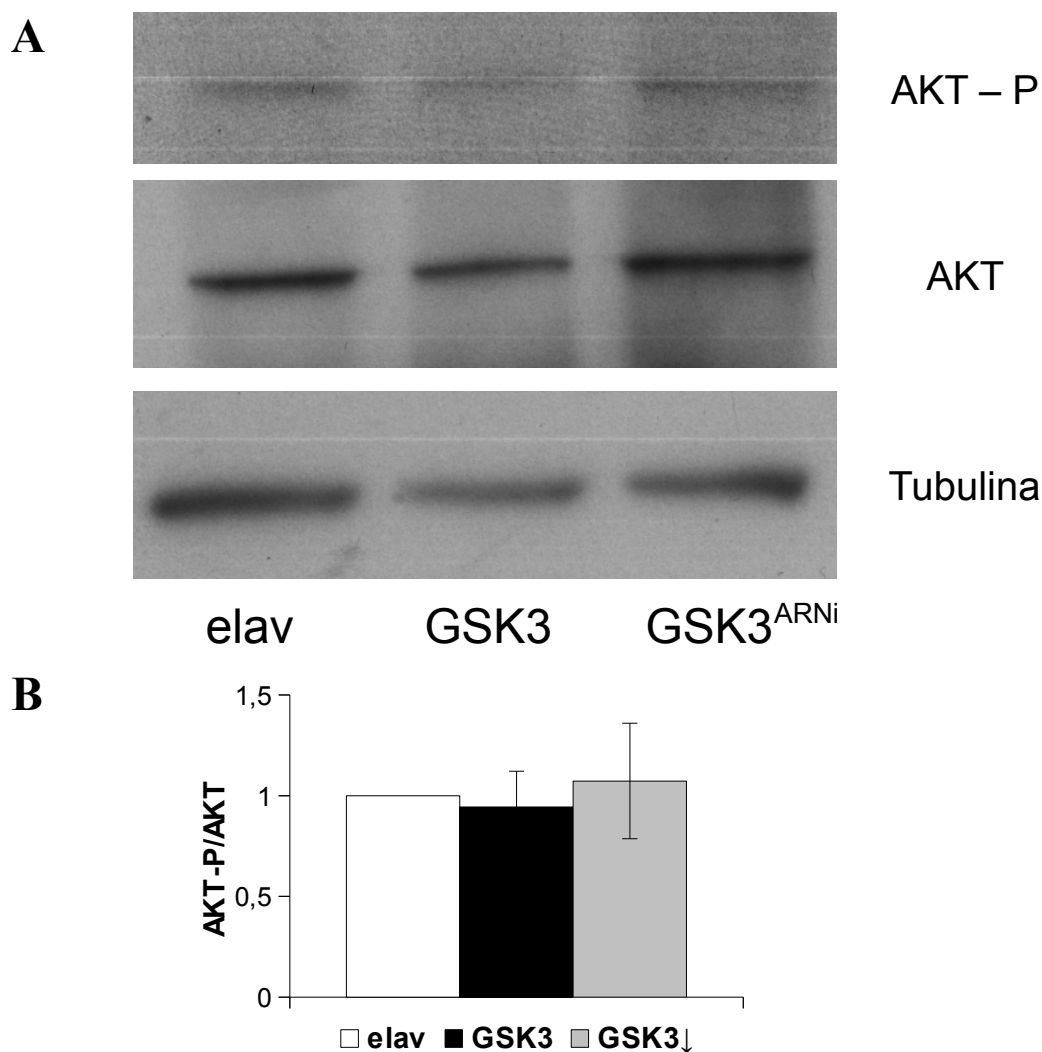


La sobreexpresión de AKT aumenta el número de sinapsis (*D42 – Gal4>UAS – AKT*;  $1012 \pm 48$ ,  $n=8$ ,  $p<0,0001$ ; **Fig. R5A – B**; Martín – Peña et al, 2006) al igual que el ARNi específico frente a GSK3 (*D42 – Gal4 > UAS– GSK3<sup>ARNi</sup>*; **Fig. R2A, D**). Sin embargo, si sobreexpresamos AKT a la vez que el ARNi frente a GSK3, los efectos sobre el número de sinapsis no se suman (*D42 – Gal4>UAS – AKT/UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>*;  $1001 \pm 79$ ,  $n=9$ ;  $p<0,0001$ ; **Fig. R5A**) indicando que ambas quinasas pertenecen a una misma ruta sinaptogénica. Por otro lado, si analizamos el número de sinapsis en mutantes heterocigotos de AKT (*D42 – Gal4; AKT<sup>-/+</sup>*, **Fig. R5D**) éstas no se ven reducidas ( $524 \pm 37$ ,  $n=12$ ; **Fig. R5A**) respecto del control (*D42 – Gal4*,  $528 \pm 35$ ,  $n=9$ ;  $p=0,9401$ ; **Fig. R5A**). Sin embargo, si combinamos los mutantes heterocigóticos de AKT con la sobreexpresión de GSK3 (*D42 – Gal4>UAS – GSK3; AKT<sup>-/+</sup>*), se anula la bajada de sinapsis debida a GSK3 ( $515 \pm 45$ ,  $n=7$ ; **Fig. R5A**). Del mismo modo, el mutante heterocigoto de AKT en combinación con la reducción de GSK3 también anula el fenotipo (*D42 – Gal4>UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>; AKT<sup>-/+</sup>*;  $619 \pm 38$ ,  $n=6$ ; **Fig. R5A, E**). Por su parte, en los mutantes homocigotos para AKT el número de sinapsis disminuye significativamente (Martín – Peña et al, 2006). Por último, se ha intentado combinar un fondo mutante homocigoto para AKT con la sobreexpresión de GSK3 (*OK6 – Gal4> UAS – GSK3; AKT<sup>-/-</sup>*) y con el ARNi frente a GSK3 (*OK6 – Gal4>UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>; AKT<sup>-/-</sup>*) pero en ambos casos no se obtuvieron larvas ya que estas combinaciones son letales. **Los resultados prueban que estas proteínas están en una misma vía sinaptogénica.**

Con el fin de completar el estudio de interacción de ambas proteínas, se analizó por WB la cantidad de AKT – P en extractos de cerebros de LIII que sobreexpresan GSK3 (*elav – Gal4>UAS – GSK3*) o expresan el correspondiente ARNi (*elav – Gal4>UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>*). En ninguno de los casos se observaron diferencias frente al control (*elav – Gal4*; **Fig. R6**). **Puesto que GSK3 no cambia la cantidad de AKT que puede ser fosforilado, GSK3 debe situarse por debajo de PI3K y AKT.**



**Figura R5. Número de sinapsis en larvas expresando AKT, GSK3 o combinaciones de ambas. A)** Número total de sinapsis en diferentes genotipos. **B)** Sobreexpresión de AKT ( $D42 - Gal4 > UAS - AKT$ ). **C)** Sobreexpresión de GSK3 y AKT al mismo tiempo ( $D42 - Gal4 > UAS - GSK3; UAS - AKT$ ). **D)** Mutante de AKT ( $D42 - Gal4; AKT^{-/+}$ ) **E)** Disminución de GSK3 y AKT ( $D42 - Gal4 > UAS - GSK3^{ARNi} / UAS - AKT^{-/+}$ ). Las fotos de la dcha. son magnificaciones de los cuadrados de la izq. Rojo:  $\alpha$  - HRP Verde: nc82. Los otros genotipos son:  $D42 - Gal4$  y  $D42 - Gal4 > UAS - GSK3$ ,  $AKT^{-/+}$ . Barras de escala en E): 10 y 5  $\mu$ m respectivamente.



**Figura R6. Cantidad de relativa de AKT – P/AKT en diferentes genotipos.** **A)** Western Blot utilizando los anticuerpos frente a AKT y AKT – P en cerebro larvario. **B)** Cuantificación de ambas proteínas en controles (*elav – Gal4*), animales sobrexpresando GSK3 (*elav – Gal4>UAS – GSK3*) y un ARNi específico frente a GSK3 (*elav – Gal4>UAS – GSK3<sup>ARNi</sup>*). Las cantidades de AKT – P y AKT están normalizados respecto a la tubulina en todos los genotipos.

## 2.2. RECEPTORES DE LA VÍA.

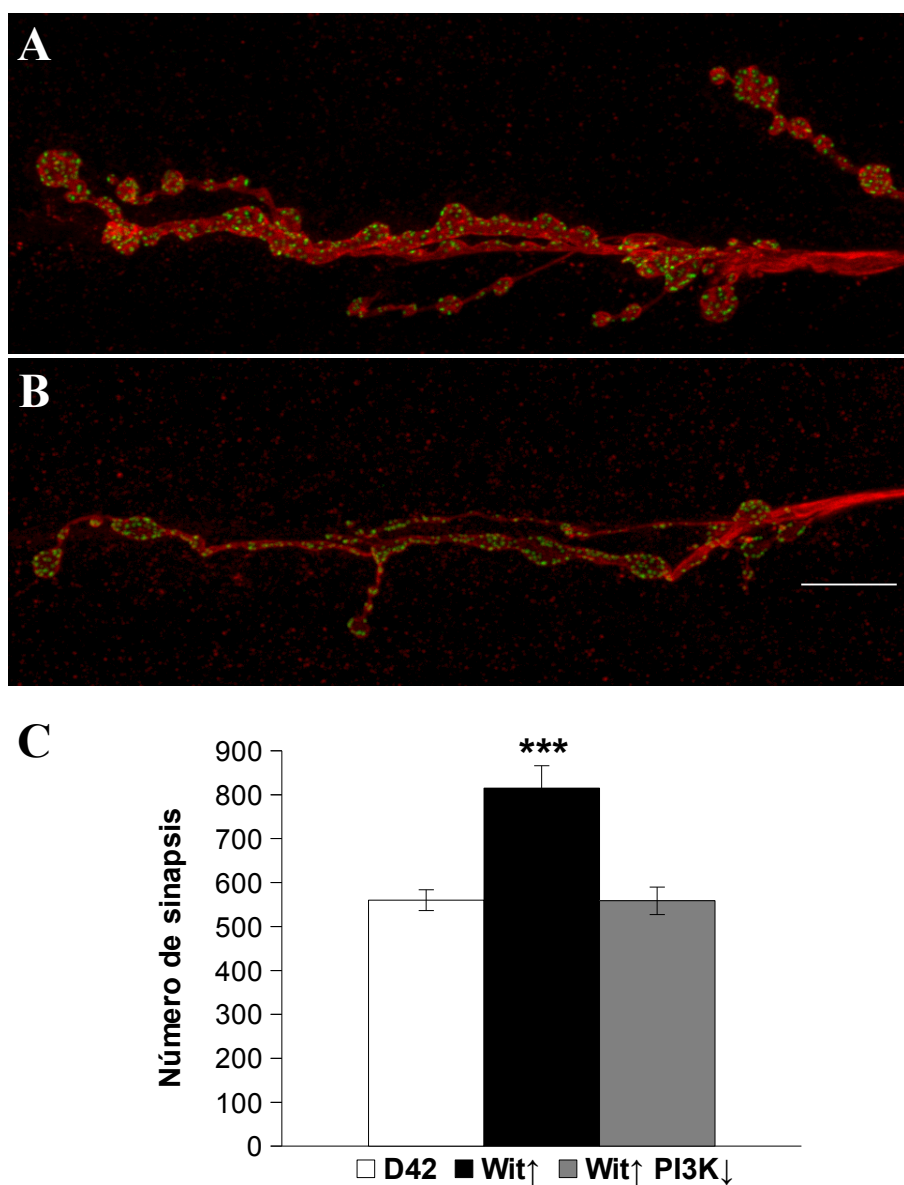
### 2.2.1. Papel de Wit y Gbb en la sinaptogénesis.

*Wishful thinking* (wit) es un receptor TGF –  $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) de tipo II. Estos receptores regulan numerosos procesos fisiológicos (revisado en Miyazono et al., 2005; Massagué, 2008). La unión del ligando induce la formación de un complejo heteromérico en

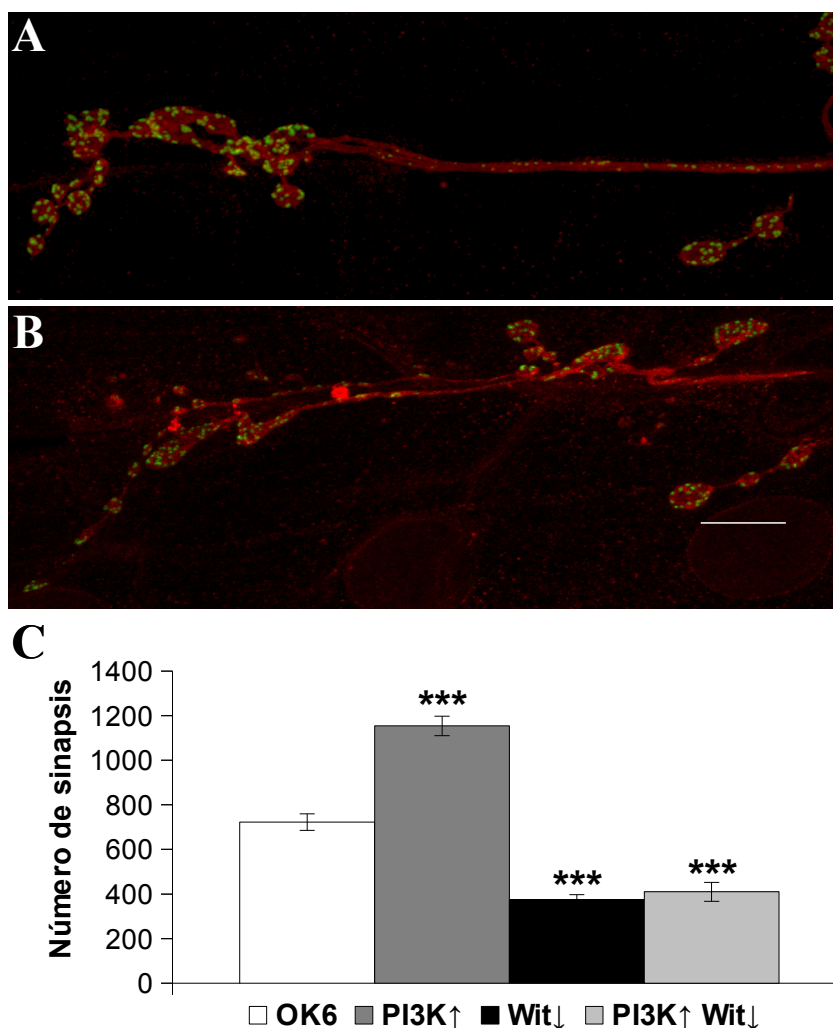
el cual los receptores de tipo II fosforilan a los de tipo I dando lugar a la activación del dominio quinasa. Este dominio puede a su vez unir y fosforilar diferentes sustratos que darán lugar a una señalización intracelular (Wrana et al, 1994; Miyazono et al, 2005). Entre estos sustratos, se encuentra PI3K (Sui et al., 2009; Perron y Dodd, 2009). Wit presenta homología con los receptores de tipo BMPRII, especialmente su dominio quinasa, siendo su región C – terminal ligeramente diferente a la de los receptores de vertebrados (Marqués et al, 2002). Los receptores de tipo BMPRII unen específicamente ligandos de tipo BMP (Proteína morfogenética de hueso) teniendo funciones importantes en la gastrulación, el desarrollo de las capas embrionarias, etc. (Beppu et al., 2000; Frisch y Wright, 1998). En *Drosophila*, Wit se expresa en el sistema nervioso, de forma presináptica, y es requerido para el crecimiento y mantenimiento de las sinapsis en el desarrollo. Sus mutantes presentan NMJ más pequeñas con menor número de botones, deficiencias electrofisiológicas, alteraciones morfológicas y una reducción en el número de zonas activas por botón (Marqués et al, 2002; Aberle et al., 2002, revisado en Marqués, 2005).

Decidimos estudiar si Wit estaba relacionado con la ruta sinaptogénica dependiente de PI3K. Analizamos el número de sinapsis en la NMJ de larvas que sobreexpresan Wit (*D42 – Gal4>UAS – wit*) utilizando los anticuerpos nc82 y anti – HRP. Puede observarse que la sinaptogénesis aumenta de forma significativa al sobreexpresar Wit ( $815 \pm 51$ ,  $n=10$ ; **Fig. R7A**) frente a su control ( $560 \pm 24$ ,  $n=10$ ,  $p=0,0001$ ; **Fig. R7C**). Además, si se coexpresa el dominante negativo de PI3K (*D42 – Gal4>UAS – wit/UAS – PI3K<sup>DN</sup>*; **Fig. R7B – C**) se suprime el fenotipo de Wit y el número de sinapsis es similar al control ( $559 \pm 31$ ,  $n=11$ ; **Fig. R7C**). Estos resultados indican que ambas proteínas podrían estar en una misma vía sinaptogénica siendo PI3K posterior a Wit. Para corroborar estos resultados sobreexpresamos PI3K con otra línea específica de motoneuronas llamada *OK6 – Gal4* (Aberle et al, 2002). Observamos un aumento significativo en el número de sinapsis cuando PI3K es sobreexpresada (*OK6 – Gal4> UAS – PI3K*,  $1154 \pm 44$ ,  $n=10$ ,  $p<0,0001$ ; **Fig. R8C**). A continuación, estudiamos el fenotipo de pérdida de función de Wit usando mutantes transheterocigóticos (*OK6 – Gal4; wit<sup>A12</sup>/wit<sup>B11</sup>*; **Fig. R8A**, Marqués et al, 2002) dado que los mutantes homocigotos son letales. Nuestros datos muestran una bajada significativa en el número total de sinapsis respecto del control ( $374 \pm 23$ ,  $n=7$ ; *OK6 – Gal4*:  $723 \pm 37$ ,  $n=10$ ,  $p<0,0001$ ; **Fig. R8C**). Finalmente, expresamos PI3K en un fondo mutante para Wit (*OK6 – Gal4>UAS – PI3K; wit<sup>A12</sup>/wit<sup>B11</sup>*). En este genotipo, PI3K no es capaz de rescatar el efecto de los mutantes de Wit en la sinaptogénesis ( $410 \pm 42$ ,  $n=7$ ,  $p<0,0001$ ; **Fig. R8B – C**). Seguramente, este efecto es debido a que

PI3K necesita ser activada por Wit. Los datos muestran que Wit y PI3K pertenecen a una misma vía sinaptogénica donde Wit sería el receptor que activa a PI3K.



**Figura R7. La sobreexpresión de Wit aumenta el número de sinapsis.** **A)** Imagen de la NMJ de una larva Wit (*D42 - Gal4 > UAS - Wit*). **B)** Larva que expresa a la vez Wit y el dominante negativo de PI3K (*D42 - Gal4 > UAS - Wit/UAS - PI3K<sup>DN</sup>*). PI3K<sup>DN</sup> suprime el efecto de Wit. **C)** Número de sinapsis en los genotipos anteriores comparados con su control (*D42 - Gal4*). Media ± Error estándar. Barra de escala: 10  $\mu$ m.



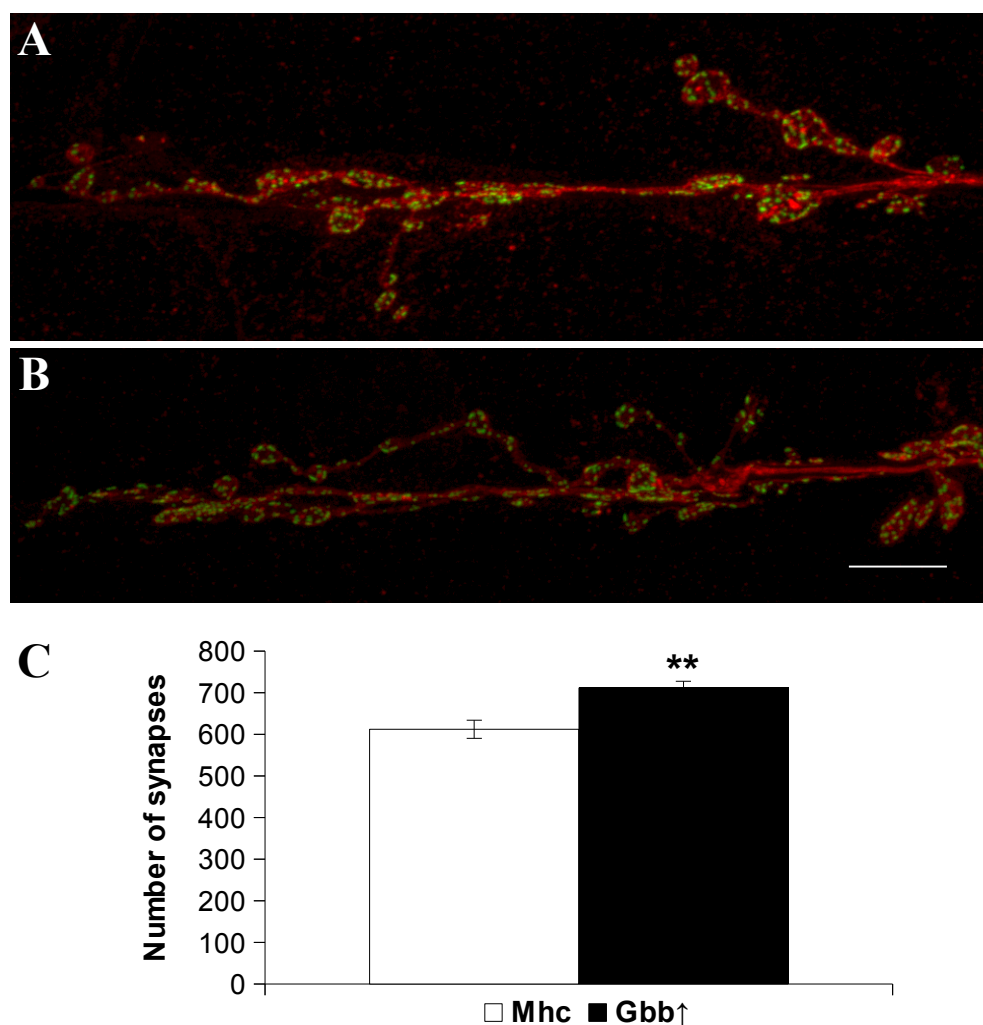
**Figura R8. Efecto de los mutantes de Wit en el número de sinapsis.** **A)** Imagen de la NMJ de un mutante transheterozigótico de Wit (*OK6 - Gal4; wit<sup>A12</sup>/wit<sup>B11</sup>*). **B)** Sobreexpresión de PI3K en un fondo mutante de Wit (*OK6 - Gal4 > UAS - PI3K; Wit<sup>A12</sup>/wit<sup>B11</sup>*). **C)** Número de sinapsis en los genotipos anteriores así como en individuos que sobreexpresan PI3K (*OK6 - Gal4 > UAS - PI3K*) comparados con su control (*OK6 - Gal4*). Media ± Error estándar. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Por su parte, *Glass botton boat* (*gbb*) es un ligando de tipo BMP (homólogo de BMP-7 en vertebrados) que se expresa de forma ubicua en embriones tardíos acumulándose en los músculos en desarrollo y en el SNC. Sus mutantes tienen fenotipos similares a los de Wit: reducción en la liberación del neurotransmisor, defectos en la morfología de la NMJ, menos botones sinápticos y de menor tamaño. Además, Gbb señala a través de Wit en la NMJ (McCabe et al, 2003; Marqués et al, 2003; revisado en Keshishian y Kim, 2004). Gbb se localiza pre- y postsinápticamente pero es requerido de forma predominante en el músculo para el mantenimiento de la estructura sináptica (McCabe et al., 2003).

Puesto que Wit tiene un papel en la sinaptogénesis, queríamos saber si Gbb actuaba como su ligando también en esta función. Se expresó Gbb en el músculo mediante el Gal4 específico Mhc – Gal4 (Schuster et al, 1996, *Mhc – Gal4 > UAS – gbb*; **Fig. R9B**) encontrándose que el número de sinapsis aumenta significativamente respecto del control ( $711 \pm 16$ ,  $n=12$  **Fig. R9C**; *Mhc – Gal4*:  $612 \pm 22$ ,  $n=9$ ,  $p=0,0015$ ; **Fig. R9A, C**). Con el fin de analizar los efectos de la falta de función de este putativo ligando, estudiamos los fenotipos de mutantes heterocigóticos y transheterocigóticos ya que los mutantes homocigóticos son letales (Wharton et al, 1999). En la **Figura R10** se muestra el fenotipo de un control (*D42 – Gal4*; **Fig. R10A**) frente al de un mutante nulo transheterocigótico de Gbb (*gbb<sup>1</sup>/gbb<sup>2</sup>*; **Fig. R10B**) en el que disminuye el número de sinapsis ( $369 \pm 87$ ,  $n=2$ ,  $p=0,0157$ ; **Fig. R10D**) así como el tamaño de la NMJ (**Fig. R10B**) tal como se conocía previamente (McCabe et al, 2003). Si se utiliza solamente uno de los alelos mutantes (*gbb<sup>1</sup>*) el número de sinapsis muestra una tendencia a la baja aunque no es estadísticamente significativa ( $483 \pm 33$ ,  $n=10$ ; **Fig. R10D**). Este fenotipo es rescatado cuando se expresa PI3K (*D42 – Gal4 > UAS – PI3K, gbb<sup>1</sup>*;  $909 \pm 54$ ,  $n=7$ ,  $p<0,0001$ ; **Fig. R10C – D**). **Por tanto, los resultados sugieren que Gbb podría ser el ligando de Wit en la sinaptogénesis situándose ambos por encima de PI3K.**

### 2.2.2. Receptores postinápticos (Htl y Btl) y sus ligandos.

*Heartless* (Htl) y *Breathless* (Btl) son los homólogos de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) en mamíferos. El primero está implicado en el desarrollo de diferentes tejidos mesodérmicos y se expresa en las células precursoras de músculo, el SNC y el sistema digestivo (Shishido et al, 1993; Wilson et al, 2004). Su nombre se debe a que sus mutantes carecen de corazón (Gisselbrecht et al., 1996). Por otro lado, Btl está implicado en el desarrollo de las tráqueas y la migración de las células gliales de la línea media (Glazer y Shilo, 1991; Shishido et al., 1993). El ligando de Btl es *Branchless* (Bnl), que al igual que su receptor, es necesario para el desarrollo de las traqueas (Sutherland et al., 1996). Por su parte, Htl también tiene dos ligandos específicos: *Pyramus* (Pyr) y *Thisbe* (Ths). Los mutantes de ambos ligandos fenocopian los de los mutantes de Htl (Gryzik and Muller, 2004; Stathopoulos et al., 2004). Ambos receptores señalizan a través de una proteína intracelular conocida por los nombres de Dof, Heartbroken o Stumps (Michelson et al., 1998).

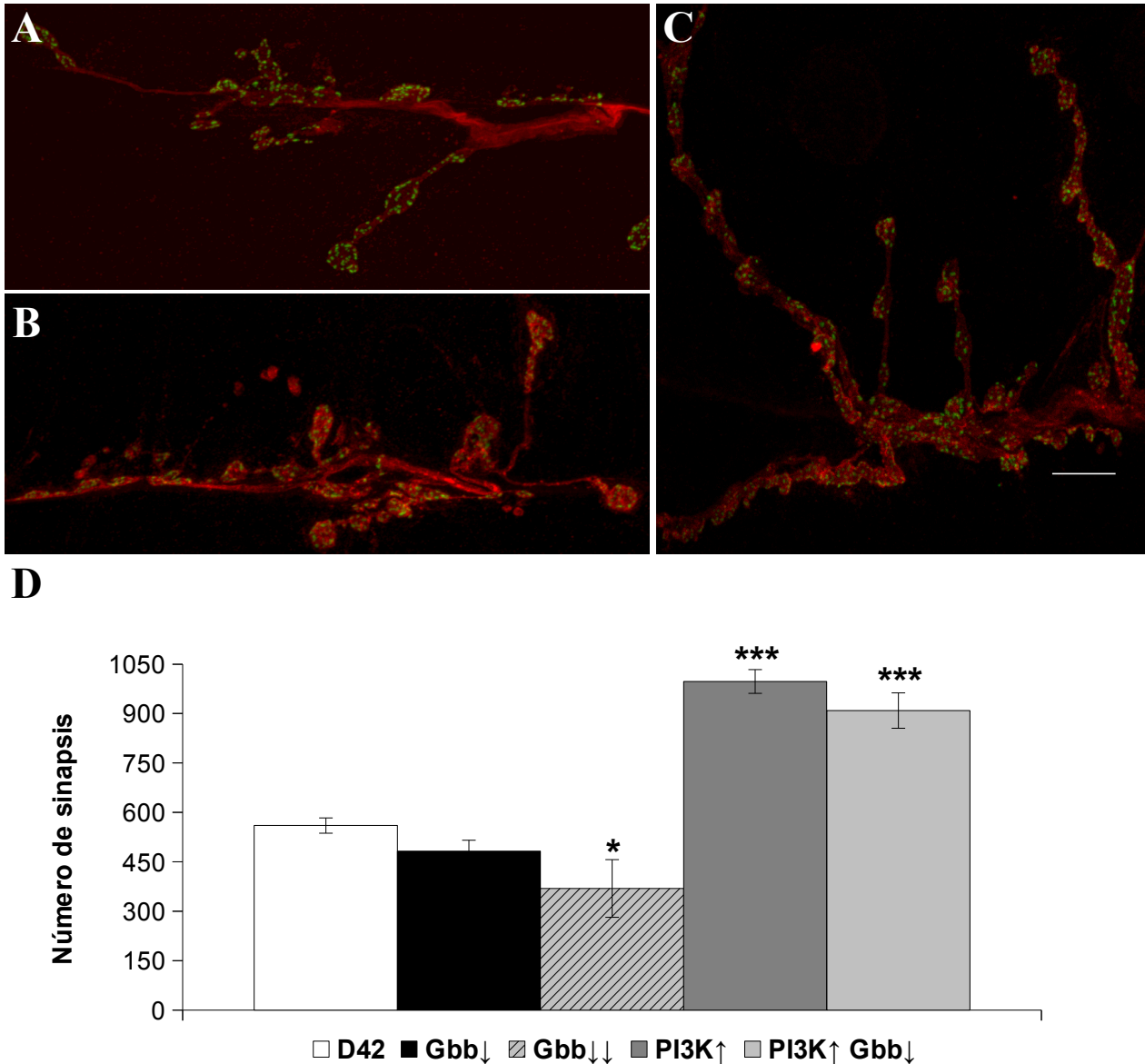


**Figura R9. La sobreexpresión de Gbb en el músculo aumenta el número de sinapsis.** **A)** Imagen de la NMJ de control (*Mhc – Gal4*). **B)** Sobreexpresión de Gbb en la zona postsináptica de la NMJ (*Mhc – Gal4> UAS – Gbb*). **C)** Número de sinapsis en ambos genotipos. El número de sinapsis en los individuos Gbb aumenta de forma significativa respecto del control. Media ± Error estándar. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

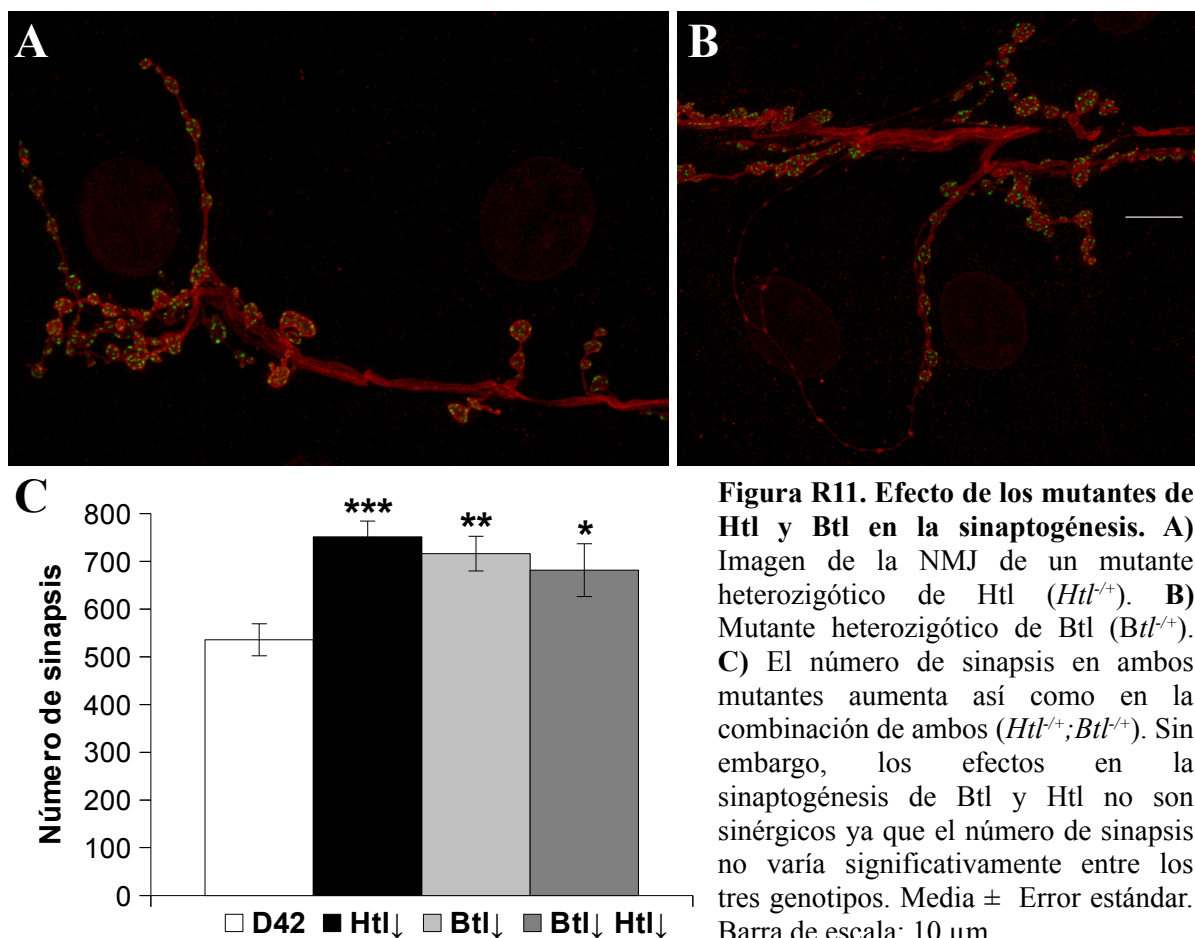
El posible papel de los receptores de tipo FGFR en la sinaptogénesis fue analizado debido a que, al tratarse de receptores de tipo tirosina quinasa, son firmes candidatos para activar la vía de señalización de PI3K (ver Introducción). En este experimento, cuantificamos el total de sinapsis en mutantes heterocigóticos de Htl y Btl (Gisselbrecht et al., 1996; Gindhart y Kaufman, 1995). En los mutantes amorfos de Htl, se incrementa el número de puntos nc82 positivos respecto del control (*htl<sup>AB42/+</sup>*: 751±33, n=8 vs *D42 – Gal4*: 536±34, n=13, p=0,0002; **Fig. R11A, C**). De modo análogo, los mutantes hipomorfos de Btl también dan lugar a una mayor cantidad de sinapsis (*btl<sup>dev1/+</sup>*: 716±36, n=8, p=0,0023; **Fig. R11B – C**). Además, se estudió el fenotipo sináptico en un doble mutante heterocigótico *htl/btl*. Éste da lugar a una subida en el número de sinapsis que es similar a



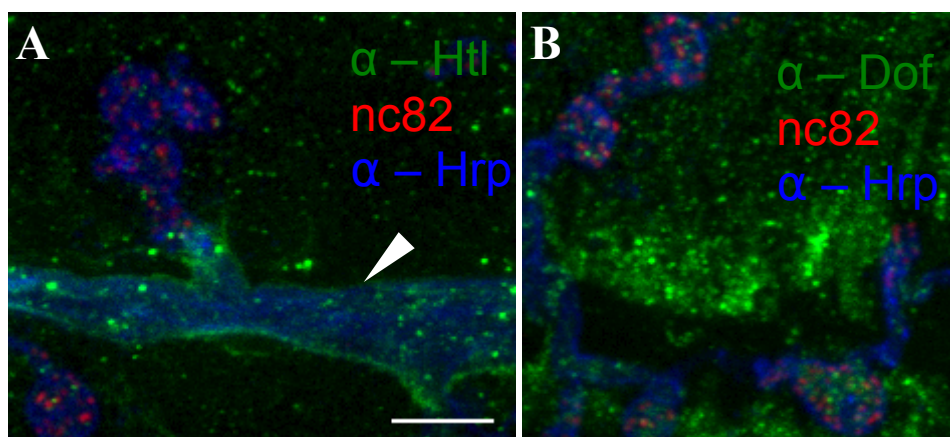
la de ambos mutantes por separado (*htl<sup>AB42/+</sup>/btl<sup>dev1/+</sup>*:  $681 \pm 55$ ,  $n=8$ ,  $p=0,0277$ ; **Fig. R11C**), es decir, su papel en la sinaptogénesis no sería sinérgico. **Estos resultados muestran que los receptores FGFR de *Drosophila* podrían ser importantes para la formación de las sinapsis en la NMJ.**



**Figura R10. Efecto de los mutantes de Gbb en la sinaptogénesis.** **A)** Imagen de la NMJ de un control (*D42 – Gal4*). **B)** Mutante transheterozigótico de Gbb (*gbb<sup>1</sup>/gbb<sup>2</sup>*). **C)** La sobreexpresión de PI3K rescata el fenotipo de los mutantes Gbb (*D42 – Gal4>UAS – PI3K, gbb<sup>1</sup>*). **D)** Número de sinapsis en los genotipos anteriores así como en mutantes heterozigóticos de Gbb (*D42 – Gal4; gbb<sup>1</sup>*) y en individuos que sobreexpresan PI3K (*D42 – Gal4>UAS – PI3K*). El número de sinapsis en la NMJ de los mutantes de Gbb se reduce. Este fenotipo es suprimido por la sobreexpresión de PI3K. Media ± Error estándar. Barra de escala: 10  $\mu$ m



Se probaron otras construcciones como un ARNi frente a Htl ( $UAS - htl^{ARNi}$ ) o la sobreexpresión de Btl ( $UAS - btl$ , constitutivamente activo, Lee et al, 1996), sin obtener ningún resultado significativo en el número de sinapsis (datos no mostrados). Aprovechando la disponibilidad de anticuerpos, se realizaron inmunotinciones con anticuerpos específicos frente a Htl o Dof (**Fig. R12A – B**) (Michelson et al, 1998; Vincent et al, 1998). En la **Figura R12A**, puede observarse que el marcaje  $\alpha - Htl$  se encuentra alrededor de la motoneurona, indicando que el receptor Htl se localiza postsinápticamente debido a su colocalización con Dlg (Sen et al., 2011). Por otro lado, en la **Figura R12B**, se aprecia que el anticuerpo anti – Dof marca específicamente todo el músculo. Un estudio reciente (Sen et al, 2011), muestra datos similares localizando a Htl y Dof en el mismo compartimento así como cambios en el número de botones y un descenso en la amplitud de la liberación espontánea sin variar la frecuencia si se sobreexpresan diferentes UAS de Htl o de Dof en el músculo. Todos estos datos confirman que Htl y Btl se expresan en la célula postsináptica (músculo).

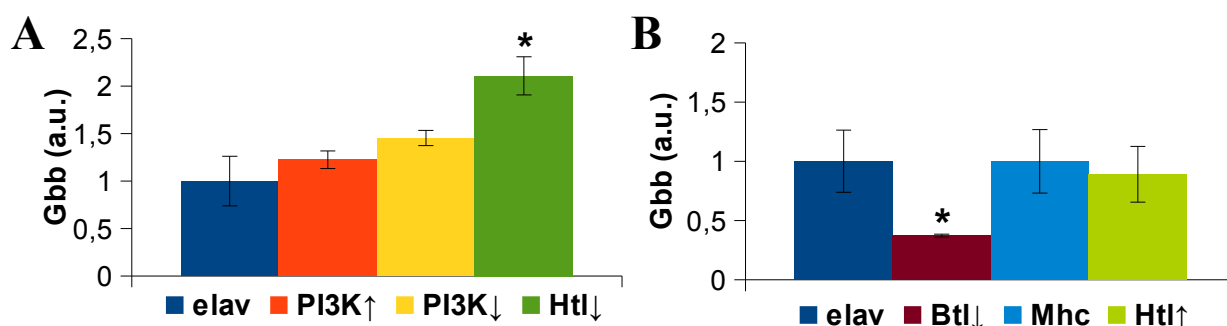


**Figura R12. Localización de Htl y Dof.** **A)** Triple inmunotinción de una NMJ para visualizar las zonas activas (nc82), la membrana de la motoneurona ( $\alpha$  – HRP) y la localización del receptor de tipo FGFR Htl ( $\alpha$  – Htl). El receptor Htl se localiza en la región postsináptica (indicando con flecha). **B)** Triple inmunotinción de una NMJ con nc82,  $\alpha$  – HRP y un anticuerpo específico contra la proteína adaptadora de los receptores FGF de *Drosophila* ( $\alpha$  – Dof). Se observa una localización en el músculo de esta proteína. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

En el apartado anterior (**Fig. R9**), se ha demostrado que Gbb es capaz de modular las sinapsis cuando es secretado desde el músculo hacia la motoneurona y se une a su correspondiente receptor Wit. Puesto que Htl y Btl parecen estar implicados en la sinaptogénesis y se expresan en la región postsináptica, decidimos estudiar si estaban regulando la expresión de Gbb. En la **Figura R13**, se muestran los resultados de las QPCRs (PCR cuantitativas) realizadas en larvas enteras de tercer estadio con una sonda específica para Gbb (ver Materiales y Métodos). En los mutantes heterocigotos de *Htl* (*elav – Gal4; Htl<sup>AB42/+</sup>*), la expresión de *gbb* aumenta  $2,1 \pm 0,2$  veces respecto del control (*elav – Gal4*, Fig. R11A). Sin embargo, si se sobreexpresa PI3K (*elav – Gal4 > UAS – PI3K*) o su dominante negativo (*elav – Gal4 > UAS – PI3K<sup>DN</sup>*) no existen diferencias con el control. También, analizamos la transcripción de *gbb* si se sobreexpresaba Htl en el músculo (*Mhc – Gal4 > UAS – Htl*). La expresión de *gbb* se reducía ligeramente ( $0,9 \pm 0,24$ ) pero sin llegar a ser significativa respecto de su control (*Mhc – Gal4*). Por último, si se analiza Gbb en larvas con un fondo hipomorfo de Btl (*elav – Gal4; Btl<sup>dev1/+</sup>*), su cantidad se ve reducida a menos de la mitad ( $0,4 \pm 0,01$ ) que el control (*elav – Gal4*). **En conjunto, los datos indican que Htl y Btl regularían la expresión de Gbb de maneras opuestas, siendo aumentada por Btl y disminuida por Htl. Respecto al número total de sinapsis ambos receptores parecen ser antisinaptogénicos.**

Por último, decidimos estudiar si la expresión de PI3K en el lado presináptico podía estar regulando de alguna forma los receptores postsinápticos de tipo FGFR. Analizamos por PCR

cuantitativa la expresión de los ligandos conocidos de Htl (Pyr y Ths) (Gyzik et al., 2004; Stathopoulos et al., 2004) y el de Btl (Bnl) (Reichman – Fried et al., 1994; Reichman – Fried y Shilo, 1995) en diferentes condiciones de sobreexpresión o regulación a la baja de PI3K (*elav – Gal4>UAS – PI3K* y *elav – Gal4 >UAS – PI3K<sup>DN</sup>* respectivamente). Como se observa en la **Figura R14**, no existen diferencias significativas en la transcripción de ninguno de los casos aunque, en el caso de *pyr* y *bnl*, existe una tendencia a la disminución cuando se sobreexpresa PI3K. A la vista de estos resultados, no parece que PI3K regule la expresión transcripcional de los ligandos de estos receptores. Es concebible que existan otros mecanismos presinápticos que regulen los receptores FGFR postsinápticos o que su regulación se deba a otro tipo celular, como por ejemplo, la glía (Franzdóttir et al., 2009).

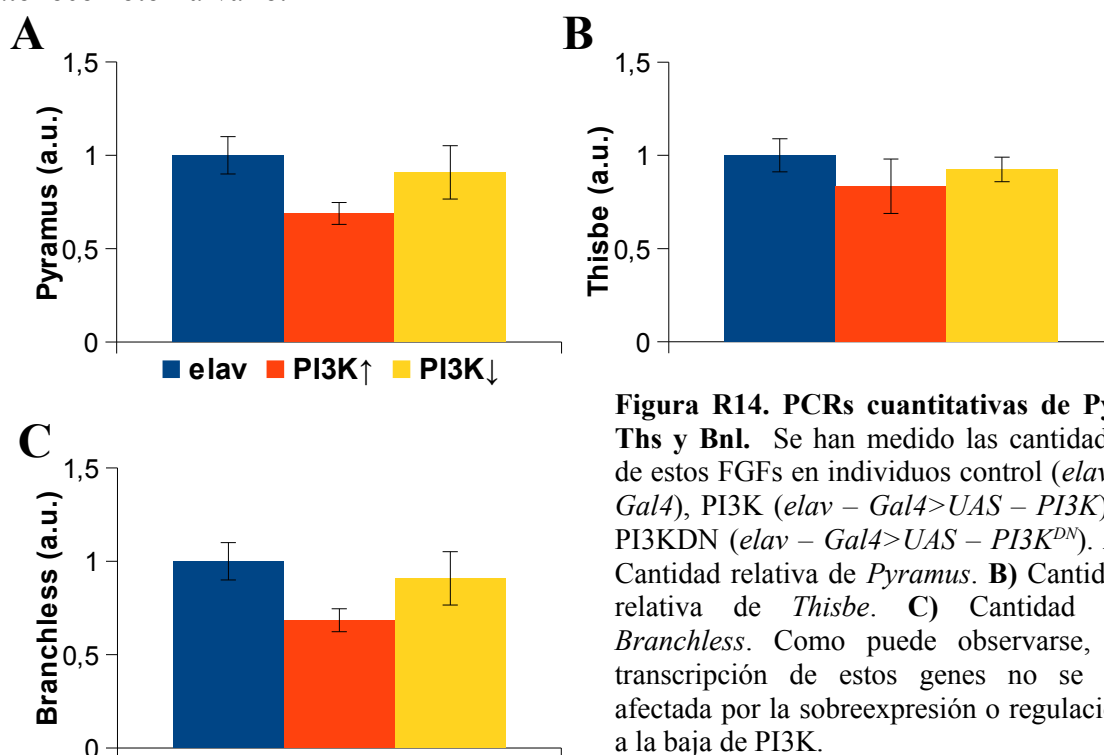


**Figura R13. Efecto en la transcripción de Gbb en diferentes genotipos.** **A)** La cantidad de Gbb transcrito ha sido medida en controles (*elav – Gal4*), individuos PI3K (*elav – Gal4>UAS – PI3K*), PI3K<sup>DN</sup> (*elav – Gal4 >UAS – PI3K<sup>DN</sup>*) y animales mutantes heterocigotos para Htl (*elav – Gal4; Htl<sup>AB42/+</sup>*). En este último, transcripción del gen *gbb* está claramente afectada aumentando 2 veces respecto al control. **B)** Cantidad de Gbb medida en mutantes heterocigotos de Btl (*elav – Gal4; Btl<sup>dev1/+</sup>*) y en animales que sobreexpresan Htl de forma postsináptica (*Mhc – Gal4>UAS – Htl*). En los mutantes de Btl, la transcripción de Gbb baja de forma significativa.

### 2.2.3. Otros receptores probados y no relacionados con la sinaptogénesis.

PI3K puede ser activada por receptores tipo tirosina quinasa entre otros (ver Introducción). Este tipo de receptores fueron los primeros en ser estudiados en su posible papel sinaptogénico. Así, Martín – Peña y colaboradores estudiaron el papel del homólogo del receptor de insulina (InR) (Martín – Peña et al., 2006). En la NMJ, la sobreexpresión de este receptor no daba lugar a un aumento en el número de sinapsis. Además, sobreexpresando InR en el cuerpo elipsoidal (EB), un núcleo central del cerebro adulto, se observa un aumento en el número de sinapsis pero también un mayor número de células por lo que, si lo hay, el putativo efecto sinaptogénico no se puede separar del proceso proliferativo. Para averiguar si el tamaño celular está correlacionado con la sinaptogénesis, estudiaron el fenotipo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en

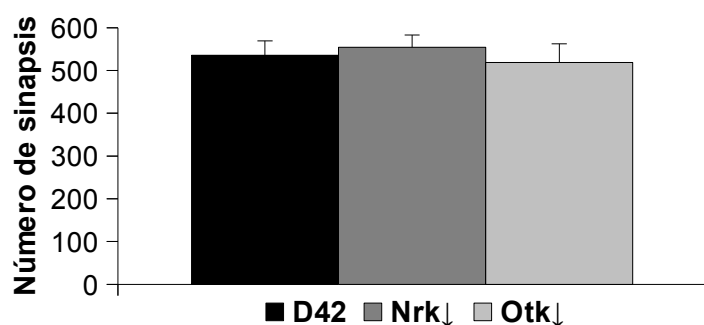
neuronas del EB, ya que este receptor controla el tamaño celular en *Drosophila* (Díaz – Benjumea y Hafen, 1994). La hiper – o hipoexpresión de EGFR efectivamente cambia el tamaño de las neuronas EB pero no afecta al número de sinapsis. Por tanto, el tamaño y el número de sinapsis no mantienen una relación causal entre sí. Por otro lado, en un estudio reciente (Rohrbough y Broadie, 2010), demostraron que el receptor postsináptico *Anaplastic Lymphoma Kinase* (Alk), que se expresa en el SNC y participa en el desarrollo del mesodermo visceral (Loren et al., 2001) junto con su ligando *Jelly Belly* (Jeb), tampoco están implicados en la sinaptogénesis pero sí en la maduración del aparato locomotor larvario.



**Figura R14. PCR cuantitativas de Pyr, Ths y Bnl.** Se han medido las cantidades de estos FGFs en individuos control (*elav – Gal4*), PI3K (*elav – Gal4>UAS – PI3K*) y PI3KDN (*elav – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*). **A)** Cantidad relativa de *Pyramus*. **B)** Cantidad relativa de *Thisbe*. **C)** Cantidad de *Branchless*. Como puede observarse, la transcripción de estos genes no se ve afectada por la sobreexpresión o regulación a la baja de PI3K.

Nosotros decidimos estudiar los receptores homólogos de los Trk (Receptores tirosina quinasa) de mamíferos. Uno de éstos es Off – track (Otk) que pertenece a la familia de receptores CCK4 (Kroiher et al., 2001). Estos receptores tienen su dominio quinasa “muerto”, es decir, tienen diferentes mutaciones que provocan la inactividad de este dominio en muchas de las proteínas de esta familia (Miller y Steele, 2000). En *Drosophila*, Otk media, *in vitro*, la adhesión homofílica entre células (Pulido et al, 1992) y, asimismo, es necesario para la invasión específica de las neuronas de tipo R en la lámina (Cafferty et al., 2004). El otro receptor es *Neurospecific receptor kinase* (Nrk). Este receptor se expresa durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario de *Drosophila* y posee actividad tirosina quinasa *in vitro* (Oishi et al., 1997). Es homólogo de MuSK (quinasa específica de músculo) en mamíferos donde este tipo de receptores son esenciales para el establecimiento y mantenimiento de las NMJs (Meriggioli and Sanders, 2009).

En la **Figura R15**, se muestran los datos obtenidos utilizando ARNi específicos frente Otk y a NrK). En ninguno de los dos casos, existen diferencias en el número de sinapsis (*D42 – Gal4>UAS– Otk<sup>ARNi</sup>*:  $518 \pm 44$ ,  $n=8$  y *D42 – Gal4>UAS – NrK<sup>ARNi</sup>*:  $554 \pm 29$ ,  $n=9$ ) frente a su control (*D42 – Gal4*:  $536 \pm 34$ ,  $n=13$ ). Asimismo, otros datos en el laboratorio (Jaime Jurado – Gómez, comunicación personal) muestran que si se expresa el receptor Torso (Rewitz et al., 2009) en la NMJ no existen cambios en el número de sinapsis (*D42 – Gal4>UAS – Torso*:  $563 \pm 31$ ,  $n=8$ ). Este dato, junto con los anteriores, prueba que si se expresa un receptor exógeno, como Torso, no se puede activar la sinaptogénesis dependiente de PI3K dado que se requieren los ligandos y los receptores específicos de la NMJ. **Por tanto, es necesaria una señalización específica para la sinaptogénesis. Nuestros datos sugieren fuertemente que es el receptor Wit con su ligando Gbb.**



**Figura R15. Receptores no implicados en la sinaptogénesis.** Los receptores de tipo tirosina quinasa NrK (*D42 – Gal4> UAS – NrK<sup>ARNi</sup>*) y Otk (*D42 – Gal4> UAS – Otk<sup>ARNi</sup>*) no tienen efecto en el número de sinapsis cuando se expresan en la NMJ de *Drosophila*.

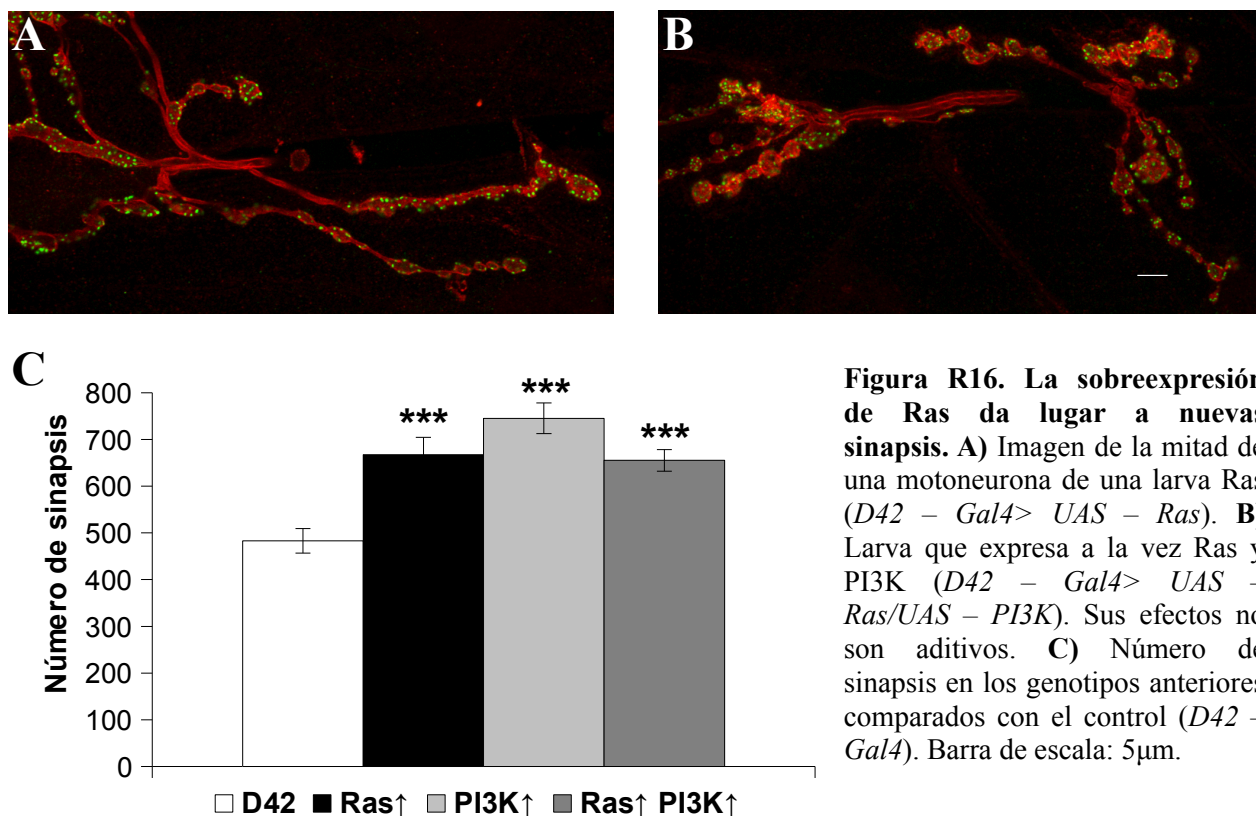
## 2.3. MAPK Y OTRAS PROTEÍNAS POR DEBAJO DE PI3K EN LA VÍA SINAPTOGÉNICA.

### 2.3.1. Ras

Ras85D (en adelante Ras) es una GTPasa pequeña homóloga de H –, N – y K – Ras en mamíferos (Neuman-Silberberg, et al., 1984). En *Drosophila*, está implicada en múltiples funciones como la determinación del destino celular en diferentes órganos (Golembo et al., 1996; Schnorr and Berg, 1996; Wassarman et al., 1995), el crecimiento celular (Prober y Edgar, 2000) o el crecimiento sináptico en la NMJ (Koh et al., 2002). Ras se expresa en los botones de la NMJ y si se reducen sus niveles disminuye el número de botones de tipo I. Por el contrario, la sobreexpresión de Ras silvestre o un Ras constitutivamente activo da lugar a un drástico aumento en el número de botones (Koh et al., 2002). Además, Ras es capaz de activar a PI3K (revisado en Vanhaesebroeck et al.,

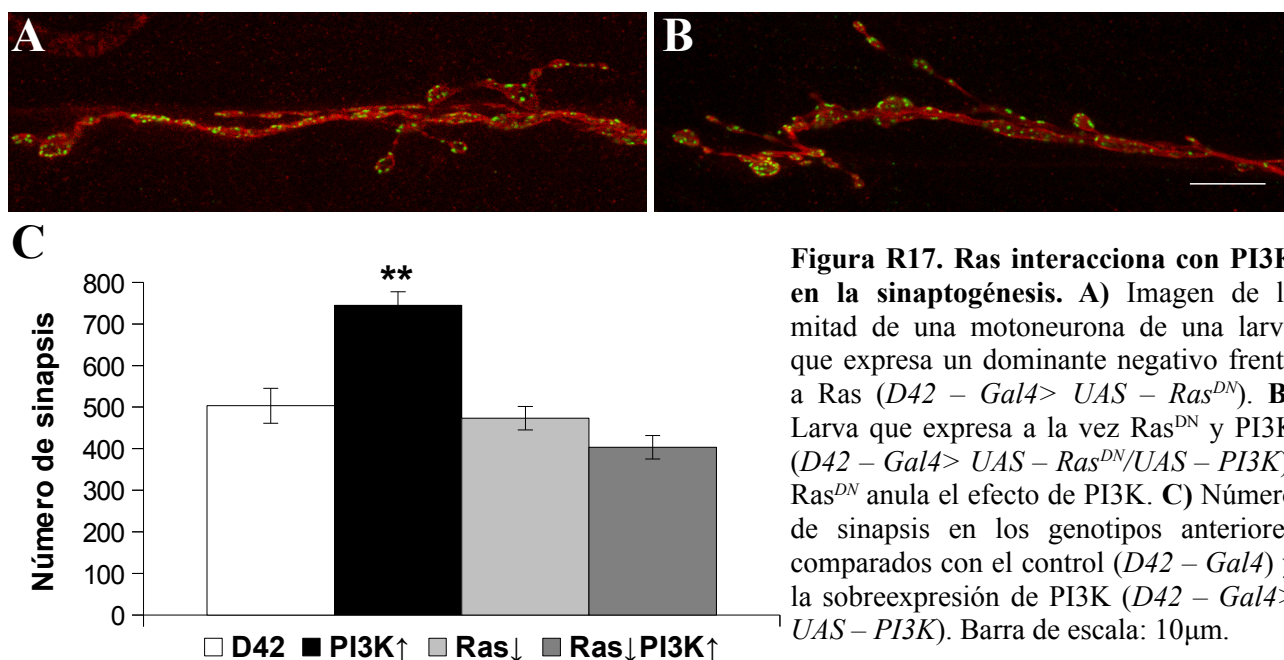


2001).



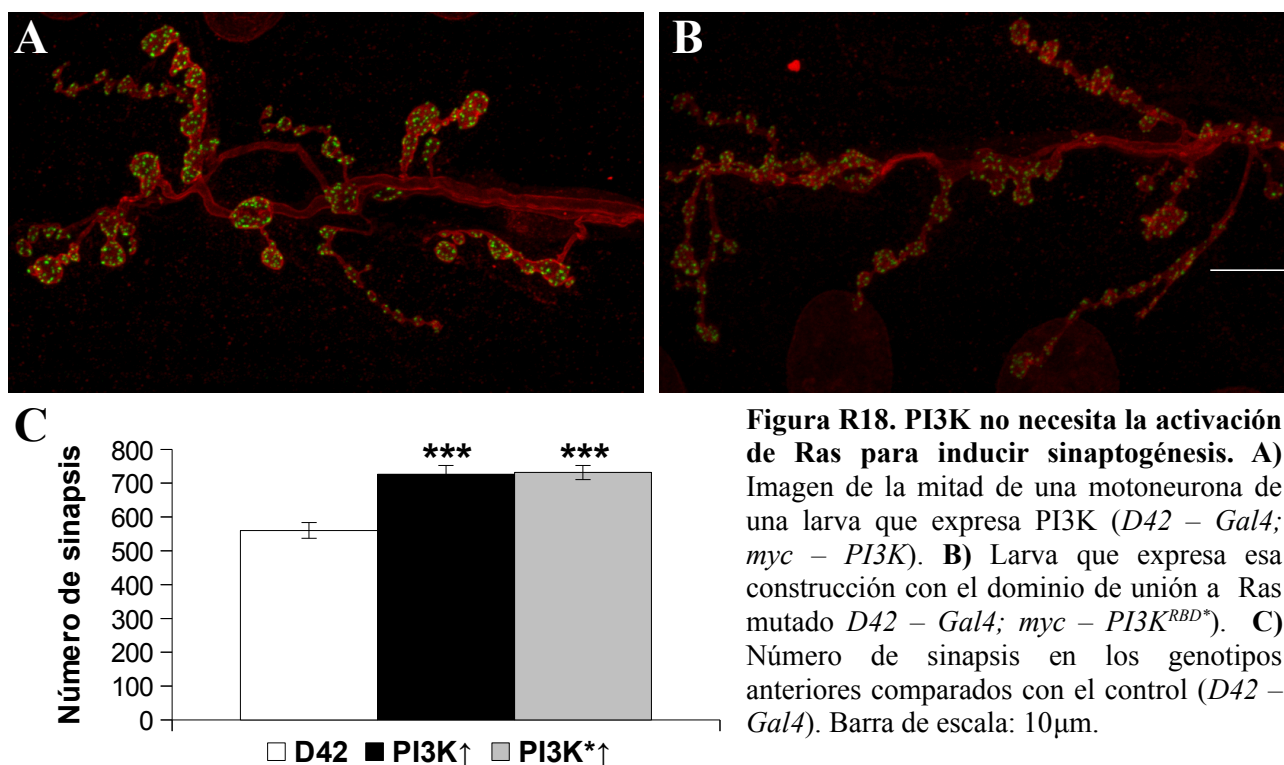
Se analizó el posible papel de Ras en la formación de sinapsis. Se observa que la sobreexpresión de Ras aumenta el número de puntos nc82 positivos (*D42 - Gal4 > UAS - Ras*;  $667 \pm 37$   $n=9$ , **Fig. R16A,C**) con respecto a su control (*D42 - Gal4*;  $483 \pm 26$   $n=9$ ,  $p=0,0009$ ; **Fig. R16C**). Las ramificaciones y número de botones también se ven aumentados en concordancia con datos previos (**Fig. R16A**) (Koh et al., 2002). Por tanto, Ras puede intervenir en el proceso sinaptogénico. Además, se coexpresó con PI3K no sumándose sus efectos ( $655 \pm 23$   $n=8$ ,  $p=0,0002$ ; **Fig. R16C**) y siendo el número total de sinapsis similar al de PI3K ( $745 \pm 33$   $n=8$ ; **Fig. R16C**). Estos datos indican que Ras tendría un papel en la formación de sinapsis y que esta función podría darse dentro de la ruta dependiente de PI3K. Para estudiar la falta de función de Ras, se cuantificó el número de sinapsis utilizando un dominante negativo de Ras (*D42 - Gal4 > UAS - Ras<sup>DN</sup>*, Bergmann et al., 1998). En este caso, el dominante negativo no parece tener un efecto *per se* (**Fig. R17A**) y el número de sinapsis se mantiene en los niveles del control ( $474 \pm 28$   $n=11$ ,  $p=0,5499$ ; **Fig. R17C**). Sin embargo, si Ras<sup>DN</sup> y PI3K son expresados de forma conjunta, el primero anula el efecto del segundo. El número de sinapsis aumenta su cantidad sólo ligeramente (*D42 - Gal4 > UAS - Ras<sup>DN</sup>/UAS - PI3K*;  $404 \pm 28$   $n=8$ ,  $p=0,0613$ ; **Fig. R17B - C**). Estos resultados pueden indicar que

PI3K necesita la activación de Ras como en muchas otras vías (Rodríguez – Viciano et al., 1994; revisado en Vanhaesebroeck et al., 2001) o que, alternativamente, Ras se sitúa de forma posterior a PI3K anulando su efecto sinaptogénico. La activación de Ras por parte de PI3K ha sido descrita previamente (revisado en Carracedo and Pandolfi, 2008; Lahlou et al., 2003; Wennstrom and Downward, 1999; Yart et al., 2002).



Existe una versión de PI3K con su dominio de unión a Ras (*Ras binding domain*, *RBD*) mutado (Orme et al., 2006). Hemos empleado esta construcción para determinar si PI3K necesita ser activado por Ras en el contexto de la sinaptogénesis. En la **Figura R18**, se muestran los datos relativos a la construcción con el dominio RBD sin mutar ( $D42 - Gal4; myc - PI3K$ , **Fig. R18A**) y con el dominio RBD mutado ( $D42 - Gal4; myc - PI3K^{RBD*}$ , **Fig. R18B**). En ambos genotipos, el número de sinapsis es el mismo ( $726 \pm 26$   $n=7$  y  $732 \pm 21$   $n=11$ , respectivamente) y mayor que el control ( $D42 - Gal4$ ;  $560 \pm 24$   $n=12$ ,  $p < 0,0001$ ; **Fig. R18C**). **Por tanto, PI3K no necesita ser activada por Ras para inducir sinaptogénesis. Este resultado sugiere que Ras se sitúa por debajo de PI3K en la ruta que da lugar a la sinaptogénesis.**





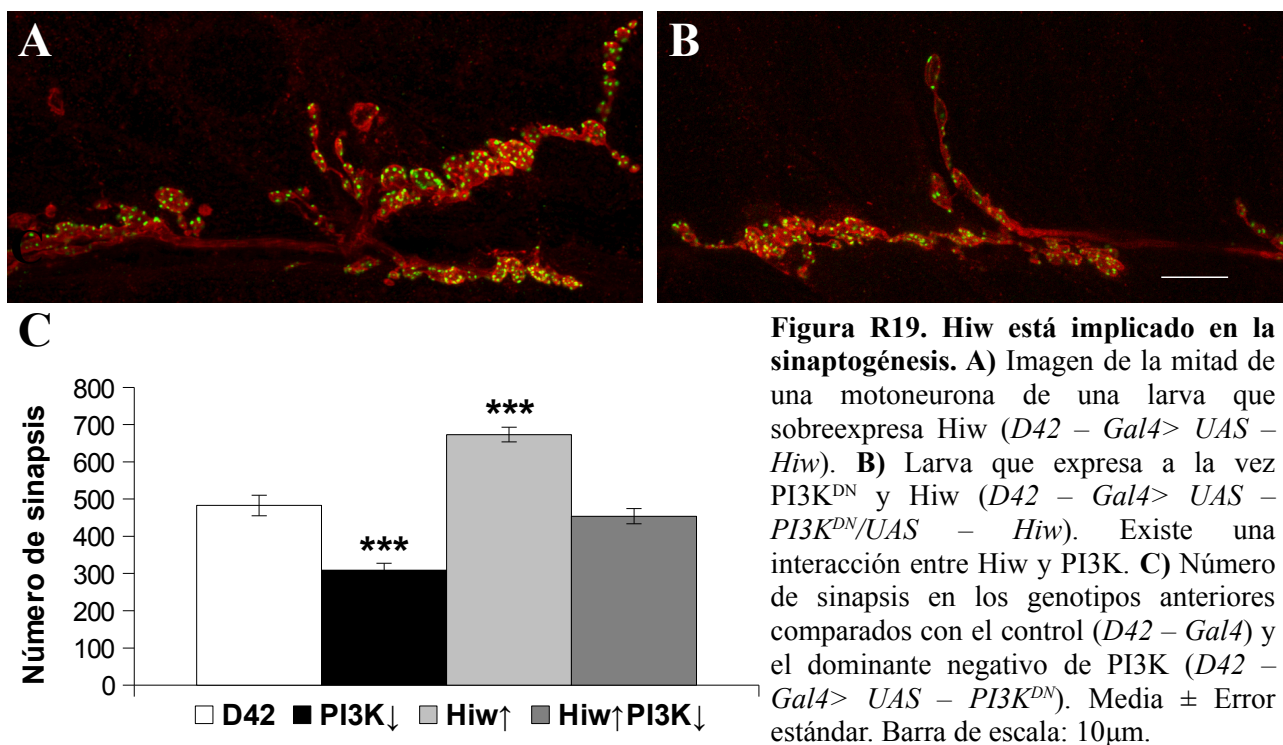
### 2.3.2. Hiw y combinaciones con PI3K

Highwire (Hiw) es una proteína de alto peso molecular (566 KDa) con múltiples dominios incluyendo los de tipo “Ring Finger” que le confieren propiedades de E3 ubiquitina ligasa, repeticiones PHR (Pam – Hiw – RPM – 1), un dominio RCC1 (Regulador de la condensación cromosómica) y un dominio de hélice superenrollada (*coiled – coil domain*) (Wan et al., 2000). Su homólogo en *C. elegans* es RPM-1 cuyas mutaciones causan sobrecrecimiento en la NMJ GABAérgica (Schaefer et al., 2000). Su homólogo en humanos es Pam (Guo et al., 1998), que también se expresa en el sistema nervioso. Las tres proteínas presentan una homología muy alta (Wan et al., 2000) con el dominio PHR propio de ellas, siendo Hiw la más grande de las tres. Además, a Hiw y RPM-1 les falta el dominio de unión a myc que sí posee Pam (Guo et al., 1998).

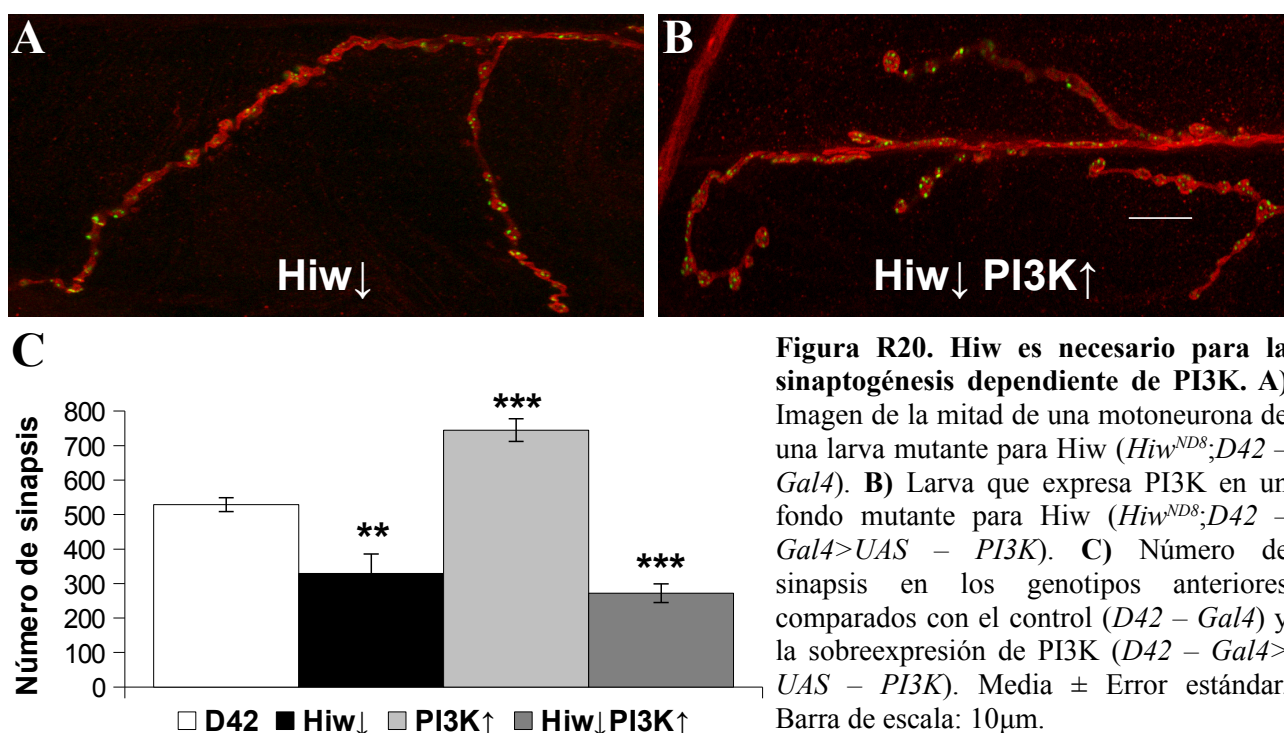
En *Drosophila*, Hiw ha sido descrita como un regulador negativo del crecimiento de la NMJ, ya que sus mutantes presentan motoneuronas de gran tamaño con ramificaciones muy finas (Collins et al., 2006; McCabe et al., 2004; Wan et al., 2000; Wu et al., 2005). Se ha descrito a Medea, un factor de transcripción homólogo de Smad 4 en humanos (Hudson et al., 1998), como uno de los

sustratos de Hiw ya que se une a la región C – terminal de Medea e inhibe el crecimiento sináptico (McCabe et al., 2004). Por otra parte, Hiw también interacciona con la vía de las MAPK (JNK) en la unión neuromuscular. Se ha demostrado que otro sustrato de Hiw es Wallenda (Wnd), homóloga de la MAPKKK de la vía de JNK de vertebrados. Hiw es capaz de restringir el crecimiento de la NMJ también mediante la inhibición de esta vía (Collins et al., 2006).

Debido a su importancia en el crecimiento de la unión neuromuscular, Hiw parecía un buen candidato para tener un papel activo en la sinaptogénesis. Esta ubiquitina ligasa fue sobreexpresada en la NMJ y se cuantificó la cantidad de Brp (puntos nc82). En la **Figura R19**, se aprecia un aumento significativo en el número de zonas activas en los individuos Hiw ( $D42 - Gal4 > UAS - Hiw$ ;  $673 \pm 20$ ,  $n=12$ , **Fig. R19A, C**) frente a su control ( $D42 - Gal4$ ;  $483 \pm 28$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,0001$ ; **Fig. R19C**). Por otro lado, si se expresa simultáneamente Hiw con el dominante negativo de PI3K, la cantidad de sinapsis es igual a la del control ( $D42 - Gal4 > UAS - Hiw / UAS - PI3K^{DN}$ ;  $454 \pm 21$ ,  $n=9$ ,  $p > 0,05$ ; **Fig. R19B – C**) y mayor que la expresión de  $PI3K^{DN}$  solo ( $D42 - Gal4 > UAS - PI3K^{DN}$ ;  $309 \pm 18$ ,  $n=8$ , **Fig. R19C**). Estos datos nos indican que existe una interacción entre PI3K y Hiw. Además, si coexpresamos Hiw con PI3K sus efectos no son aditivos ( $D42 - Gal4 > UAS - Hiw / UAS - PI3K$ ;  $663 \pm 19$ ,  $n=10$ ) indicando de nuevo la participación de ambas proteínas en una misma vía.



Para analizar el efecto de la falta de función de Hiw se empleó un mutante hemicigótico de Hiw ( $Hiw^{ND8}; D42 - Gal4$ ; Wan et al., 2000, DiAntonio et al., 2001). Los datos muestran una disminución en el total de sinapsis ( $329 \pm 56$ ,  $n=6$ , **Fig. R20A, C**) frente a los dos genotipos de referencia: el control  $D42 - Gal4$ ;  $529 \pm 20$   $n=9$ ,  $p=0,002$  (**Fig. R20C**) y un mutante heterocigótico para Hiw:  $Hiw^{ND8}/+; D42 - Gal4$ ;  $479 \pm 24$   $n=7$ ,  $p=0,0254$ . Puede apreciarse también, que existe un sobrecrecimiento de la NMJ tal como fue descrito en trabajos previos (Collins et al., 2006; McCabe et al., 2004; Wan et al., 2000; Wu et al., 2005). Este resultado parece lógico ya que no se estaría inhibiendo la vía de JNK (Collins et al., 2006). Por otro lado, si se sobreexpresa PI3K en un fondo mutante hemicigótico para Hiw ( $Hiw^{ND8}; D42 - Gal4 > UAS - PI3K$ ) el número de sinapsis es inferior al control ( $272 \pm 27$ ,  $n=9$ ,  $p < 0,0001$ ; **Fig. R20B y C**). En cambio, si el fondo mutante es heterocigótico ( $Hiw^{ND8}/+; D42 - Gal4 > UAS - PI3K$ ) el número de sinapsis es similar al de la expresión solo de PI3K ( $724 \pm 32$ ,  $n=11$  **Fig. R20C** vs  $D42 - Gal4 > UAS - PI3K$ ;  $745 \pm 33$ ,  $n=8$ ). **Este experimento indica que PI3K y Hiw interaccionan funcionalmente.**



### 2.3.3. Vía de las MAPK (JNK)

Como se ha comentado antes, Wallenda es la homóloga en *Drosophila* de la primera MAPK

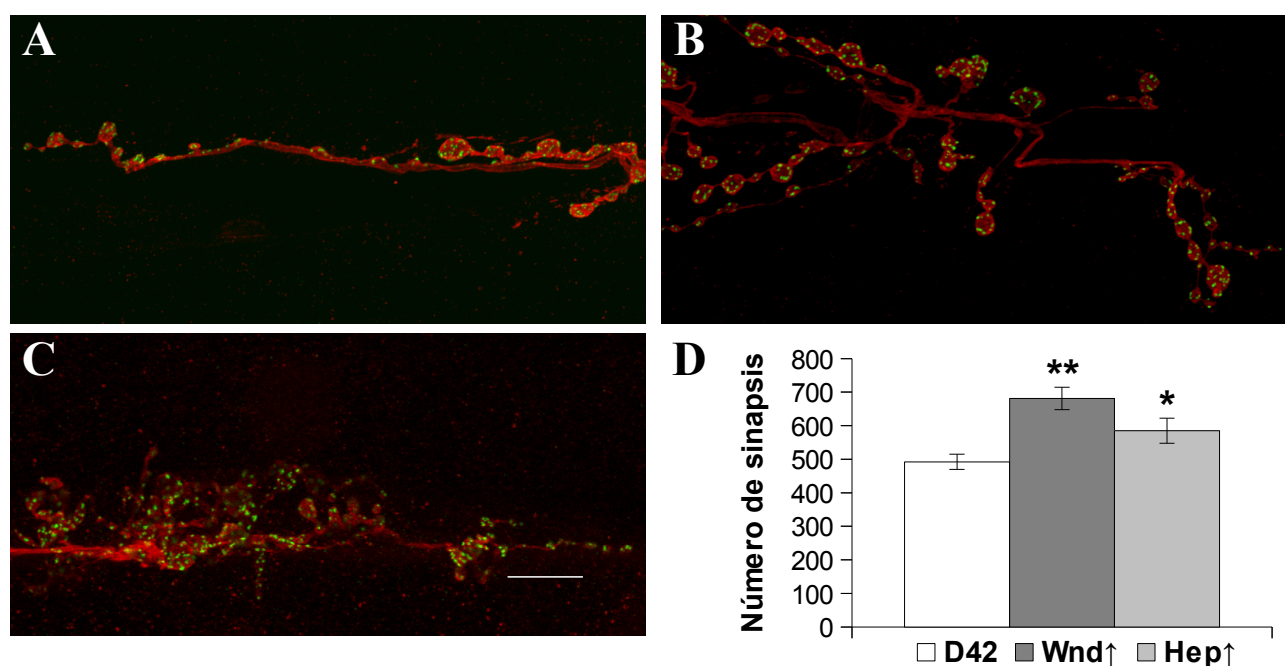
de la vía de JNK en vertebrados. Esta proteína fue descrita en un rastreo para buscar supresores del fenotipo de sobrecrecimiento de Hiw en la NMJ (Collins et al., 2006) y es homóloga de las quinasas de vertebrados DLK/LZK. La sobreexpresión de Wnd da lugar a un fenotipo similar al de los mutantes de Hiw y, además, Wnd se expresa en la NMJ (Collins et al., 2006).

La segunda MAPK de la vía de JNK en *Drosophila* es Hemipterous (Hep). Se describió como una proteína esencial en el desarrollo: necesaria para el cierre dorsal y el movimiento de las células en la lámina epitelial durante la embriogénesis (Glise et al., 1995). Es homóloga de MKK4 en mamíferos (Glise et al., 1995). De forma más reciente, se ha estudiado su papel en el crecimiento sináptico. La sobreexpresión de una forma constitutivamente activa (Hep<sup>Act</sup>), aumenta alrededor de un 30% el tamaño de la NMJ y disminuye la liberación del neurotransmisor. Además, esta sobreexpresión aumenta la cantidad de JNK – P (Etter et al., 2005).

La última proteína de esta vía es Basket (Bsk) que es homóloga de la JNK de mamíferos. Al igual que Hep, es necesaria en la embriogénesis (Glise y Noselli, 1997; Reed et al., 2001; Zu et al., 1998). En los últimos años, al igual que Wnd y Hep, se ha determinado el papel de Bsk en el desarrollo de la NMJ. Así, si se expresa un dominante negativo de Bsk (Bsk<sup>DN</sup>) en un fondo mutante para Hiw se anula el fenotipo de esta última en la NMJ (Collins et al., 2006).

Como se ha mostrado en el apartado anterior (2.3.2), Hiw juega un papel en la sinaptogénesis. Además, esta E3 ubiquitina ligasa se había relacionado anteriormente con la vía de JNK en la unión neuromuscular. Por ello, era necesario estudiar el posible papel de estas MAPK en el desarrollo de las sinapsis. La sobreexpresión de Wnd (*D42 – Gal4 > UAS – Wnd*) se muestra en la **Figura R21**. En el panel B, se aprecia claramente el crecimiento de la NMJ debido al incremento de Wnd (de forma similar a Collins et al., 2006) así como un mayor número de puntos nc82 positivos, es decir, una mayor cantidad de sinapsis ( $681 \pm 34$ ,  $n=11$ , **Fig. R21D**) frente a su control (*D42 – Gal4*;  $492 \pm 23$ ,  $n=16$ ,  $p=0,0079$ ). Este resultado indica que las MAPK de la vía de JNK podrían tener un papel en la sinaptogénesis. Se intentó estudiar el fenotipo de bajada de Wnd mediante el uso de un ARNi pero dicha construcción no es funcional. Experimentos futuros utilizando otros ARNi o mutantes de Wnd (Collins et al., 2006) serán necesarios para caracterizar completamente su papel en la sinaptogénesis. A continuación, se analizó la siguiente MAPK de la lista: Hep. El aumento de expresión de esta quinasa en la NMJ da lugar a un ligero incremento en la cantidad de

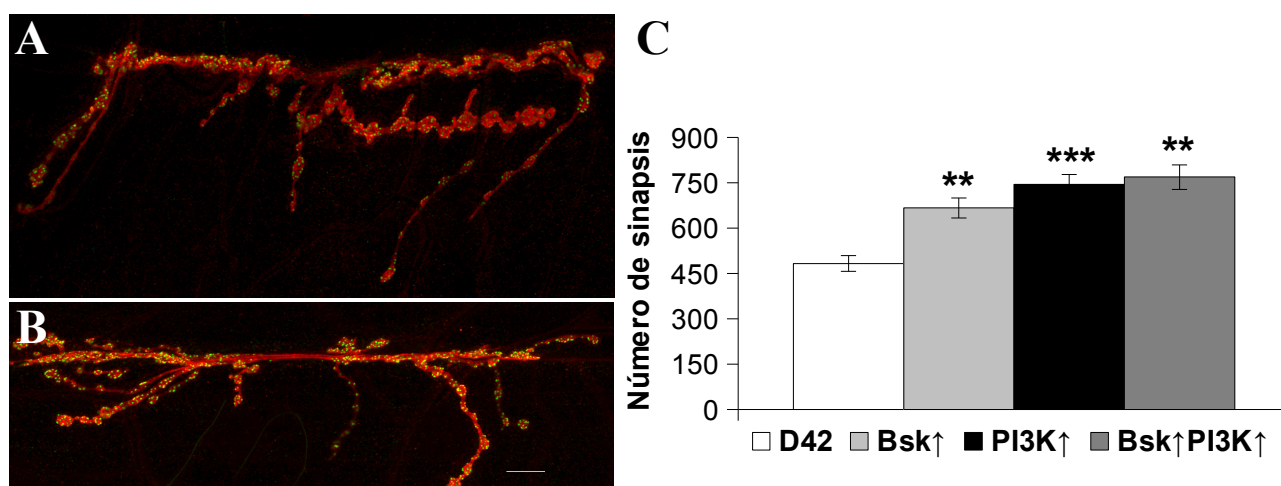
sinapsis ( $D42 - Gal4 > UAS - Hep$ ;  $585 \pm 37$ ,  $n=10$ , **Fig. R21C – D**) así como al tamaño de la NMJ (**Fig. R21C**) (Etter et al., 2005). Seguidamente se estudió el papel de la tercera MAPK, Bsk, en este proceso empleando larvas que sobreexpresaban Bsk en las fibras 6/7 de la NMJ ( $D42 - Gal4 > UAS - Bsk$ , **Fig. R22A**). Como las otras MAPK de la vía, Bsk tiene un claro papel sinaptogénico ( $667 \pm 33$ ,  $n=10$ , **Fig. R22C**). De nuevo, el tamaño de la NMJ es mayor con más ramificaciones y botones (**Fig. R22A**). Asimismo, si coexpresamos Bsk junto con PI3K sus efectos no son aditivos ( $D42 - Gal4 > UAS - Bsk/UAS - PI3K$ ;  $769 \pm 41$   $n=11$ ) siendo probable que ambas quinasas formen parte de una misma ruta. Se estudió también el efecto de un dominante negativo de Bsk ( $D42 - Gal4 > UAS - Bsk^{DN}$ ) pero, al igual que el dominante negativo de GSK3 ( $UAS - GSK3^{DN}$ , **Fig. R2**) y aunque la construcción funciona (Collins et al., 2006; otros datos del laboratorio), su efecto en cambiar el número de sinapsis era nulo ( $536 \pm 28$ ,  $n=10$ ). Sería necesario el uso de mutantes o de una construcción  $UAS - Bsk^{ARNi}$  para completar este estudio.



**Figura R21. Efecto de Wnd y Hep en la formación de nuevas sinapsis.** A) Imagen de la NMJ de una larva control ( $D42 - Gal4$ ). B) Larva que expresa Wnd ( $D42 - Gal4 > UAS - Wnd$ ). C) Motoneurona expresando Hep ( $D42 - Gal4 > UAS - Hep$ ). D) Número de sinapsis en los genotipos anteriores. Media  $\pm$  Error estándar. Barra de escala: 10µm.

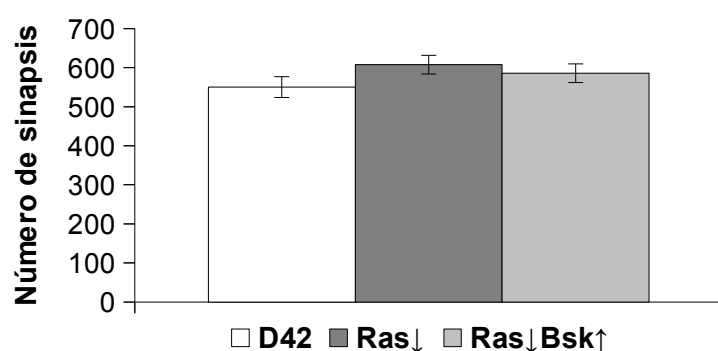
Los datos mostrados en este apartado indican que la vía de JNK no solo tendría un efecto en el control del crecimiento de la motoneurona sino también en la formación de los contactos sinápticos. Esta nueva función estaría, probablemente, compartiendo la misma vía sinaptogénica que PI3K.





**Figura R22. Bsk aumenta el número de sinapsis.** A) Fotografía de una motoneurona en la fibra 6/7 de una larva que sobreexpresa Bsk (*D42 - Gal4 > UAS - Bsk*). B) Larva que coexpresa PI3K y Bsk (*D42 - Gal4 > UAS - PI3K/UAS - Bsk*). C) Número de sinapsis en los genotipos anteriores comparados con el control (*D42 - Gal4*) y la sobreexpresión de PI3K (*D42 - Gal4 > UAS - PI3K*). Media  $\pm$  Error estándar. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Finalmente, se estudió la posible interacción entre Ras y Bsk, ya que habíamos demostrado la pertenencia de la pequeña GTPasa a la ruta dependiente de PI3K (Ver apartado 2.3.1). Los datos mostrados en la **Figura R23** indican que si expresamos de forma conjunta Bsk y el dominante negativo de Ras (*D42 - Gal4 > UAS - Bsk/UAS - Ras<sup>DN</sup>*) el efecto del primero en la sinaptogénesis se ve anulado ( $586 \pm 28$ ,  $n=11$ ) quedando en niveles similares a los del control (*D42 - Gal4*;  $550 \pm 27$ ,  $n=6$ ,  $p > 0,05$ ) y del Ras<sup>DN</sup> solo ( $607 \pm 24$ ,  $n=10$ ). Pensamos que se debe a que la vía de JNK necesita ser activada o cooperar con Ras (Minden et al, 1994b; Igaki et al., 2006; Brumby et al., 2011). **Este experimento complementaría los resultados previos indicando que PI3K, Ras y la vía de JNK actúan en conjunto para formar nuevas sinapsis (Fig. R16 - 17, 21 - 22).**



**Figura R23. Bsk necesita la activación de Ras para formar nuevas sinapsis.** Número de sinapsis en individuos control (*D42 - Gal4*), individuos que sobreexpresan el dominante negativo de Ras (*D42 - Gal4 > UAS - Ras<sup>DN</sup>*) y larvas que coexpresan Ras<sup>DN</sup> y Bsk (*D42 - Gal4 > UAS - Ras<sup>DN</sup>/UAS - Bsk*). Media  $\pm$  Error estándar.

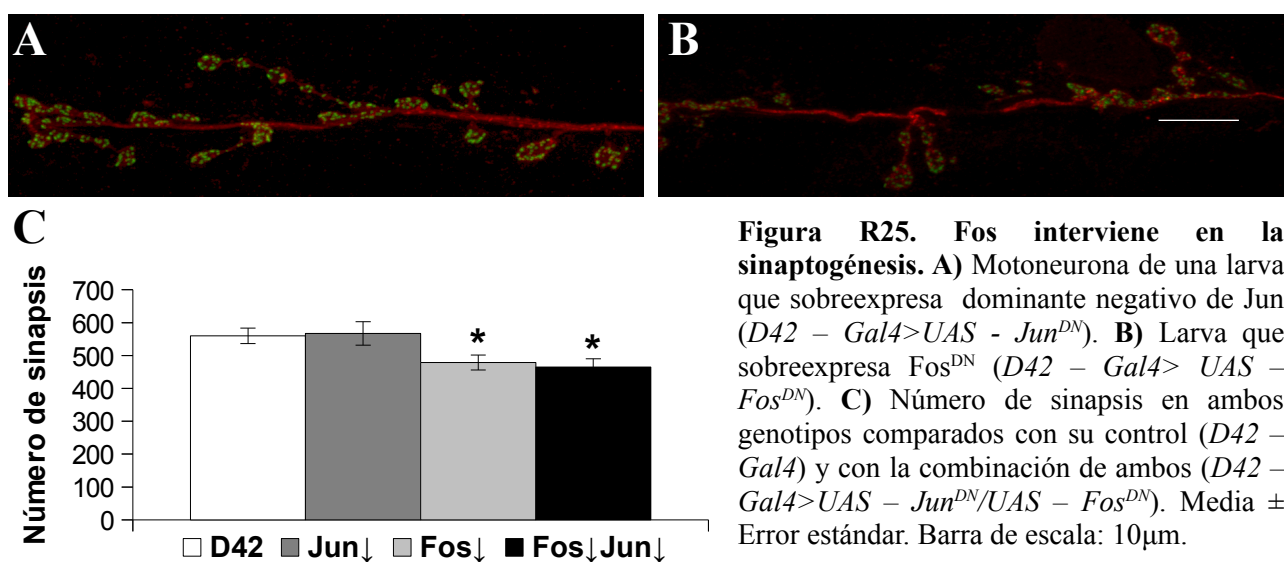
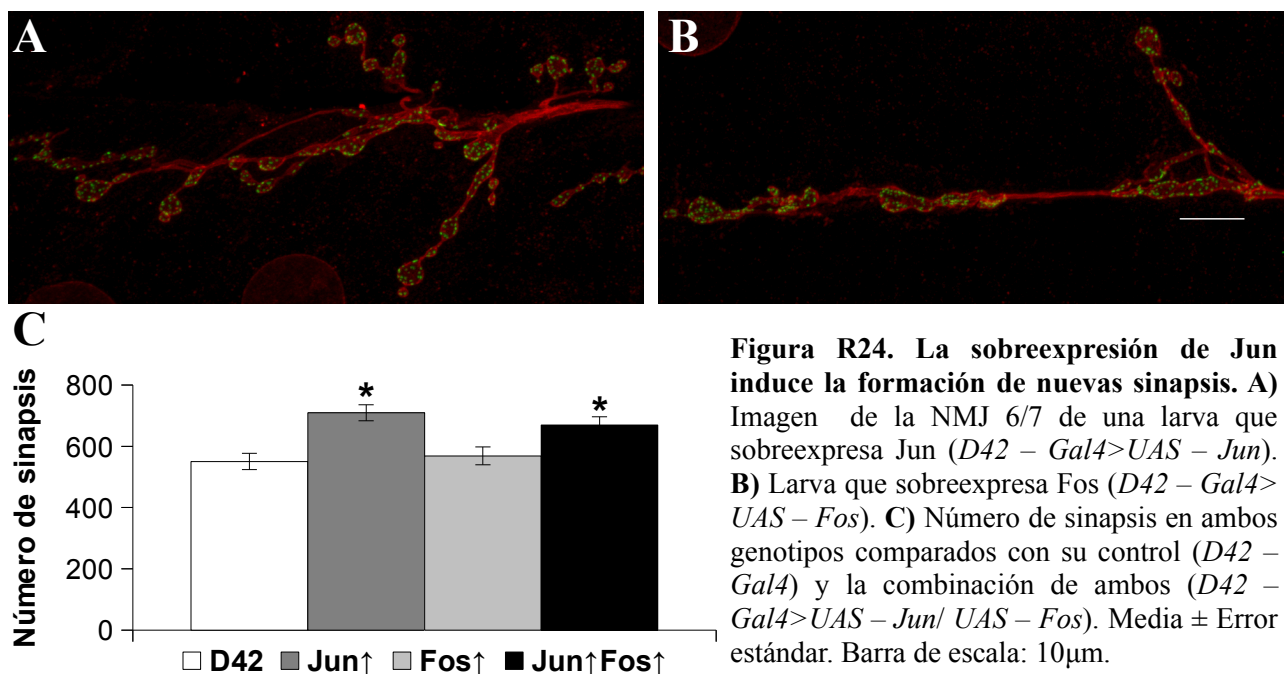
## 2.4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

### 2.4.1. Jun y Fos.

Jun y Fos son dos factores de transcripción que, normalmente, se unen y forman heterodímeros dando lugar al complejo AP – 1 (Proteína activadora 1; Ciapponi y Bohmann, 2002). Ambos tienen múltiples funciones en el desarrollo (Perkins et al., 1990; Riesgo – Escovar y Hafen, 1997), por ejemplo, Fos es fundamental para la inducción del endodermo en la vía de señalización de *Decapentaplegic* (Dpp). Además, junto con las otras proteínas de la vía de JNK, sendos factores están implicados en la respuesta inmune (Sluss et al., 1996; Kim et al., 2005). Sin embargo, los nuevos estudios, a lo largo de la última década, se han centrado más en el papel de estos dos factores de transcripción, junto con las MAPK de la vía de JNK, en la plasticidad neuronal y la formación de la memoria en mamíferos (Gass et al., 2004; Bevilaqua et al., 2003). En *Drosophila*, la vía de JNK controla el crecimiento sináptico (Collins et al., 2006; Etter et al., 2005) y la plasticidad sináptica (Sanyal et al., 2002).

Nuestros resultados muestran que Bsk y las otras MAPK de la vía de JNK están implicadas en la sinaptogénesis dependiente de PI3K. Por lo tanto, la sobreexpresión de Jun y Fos fue analizada para intentar revelar otros elementos de la ruta. En la **Figura R24**, se muestra la expresión al alza de Jun (*D42 – Gal4>UAS – Jun*, **Fig. R24A**) donde se observa un incremento de la cantidad de sinapsis ( $709 \pm 26$ ,  $n=11$ ) respecto de su control (*D42 – Gal4*;  $550 \pm 27$ ,  $n=6$ ,  $p=0,0055$ , **Fig. R24C**) así como un aumento en las ramificaciones de la NMJ (**Fig. R24A**). Sin embargo, la sobreexpresión de Fos en la NMJ no aumenta el total de sinapsis ( $569 \pm 29$ ,  $n=10$ ,  $p=0,4951$ , **Fig. R24B – C**). Si ambos son coexpresados en la motoneurona 6/7 el número de sinapsis es similar al de Jun solo (*D42 – Gal4>UAS – Jun/UAS – Fos*;  $669 \pm 27$ ,  $n=10$ ,  $p=0,0068$ , **Fig. R24C**). Aparentemente, este dato indicaba que sólo Jun tiene un papel sinaptogénico. Respecto a la condición de hipoexpresión de Jun y Fos, la **Figura R25** muestra los efectos de un dominante negativo de Jun (*D42 – Gal4>UAS – Jun<sup>DN</sup>*), otro de Fos (*D42 – Gal4>UAS – Fos<sup>DN</sup>*) y la combinación de ambos (*D42 – Gal4>UAS – Jun<sup>DN</sup>/UAS – Fos<sup>DN</sup>*). El Jun<sup>DN</sup> no varía el número de sinapsis respecto de su control ( $567 \pm 36$   $n=10$  y  $560 \pm 24$   $n=10$ , respectivamente,  $p=0,4396$ ). Por el contrario, la expresión de Fos<sup>DN</sup> causa una ligera disminución en la cantidad de contactos sinápticos ( $479 \pm 23$ ,  $n=11$ ,  $p=0.0253$ ). Si se combina la expresión de ambos, el número de sinapsis se queda al nivel de Fos<sup>DN</sup> ( $465 \pm 25$ ,  $n=12$ ,

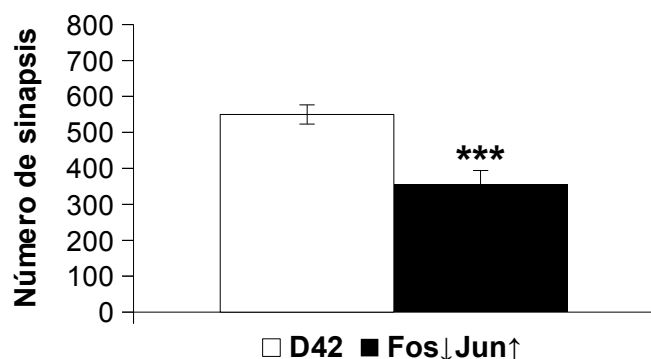
$p=0,0129$ ). Este resultado demuestra que Fos también tiene un papel en la sinaptogénesis. Además, de estos dominantes negativos, utilizamos ARNi específicos frente a Fos y Jun pero no eran funcionales (dato no mostrado).



A continuación, analizamos el fenotipo resultante de combinar la sobreexpresión de Jun con el dominante negativo de Fos (*D42 - Gal4>UAS - Jun/UAS - Fos<sup>DN</sup>*; **Fig. R26**). En este caso, se producía una bajada de sinapsis más acusada que la de Fos<sup>DN</sup> solo ( $355 \pm 39$ ,  $n=9$ ,  $p=0,0002$ ) anulando los efectos sinaptogénicos de la subida de Jun. **Este resultado indica que ambas**



proteínas (Fos y Jun) actuarían juntas en la ruta sinaptogénica formado posiblemente heterodímeros como en otras funciones descritas previamente (Ciapponi y Bohmann, 2002).



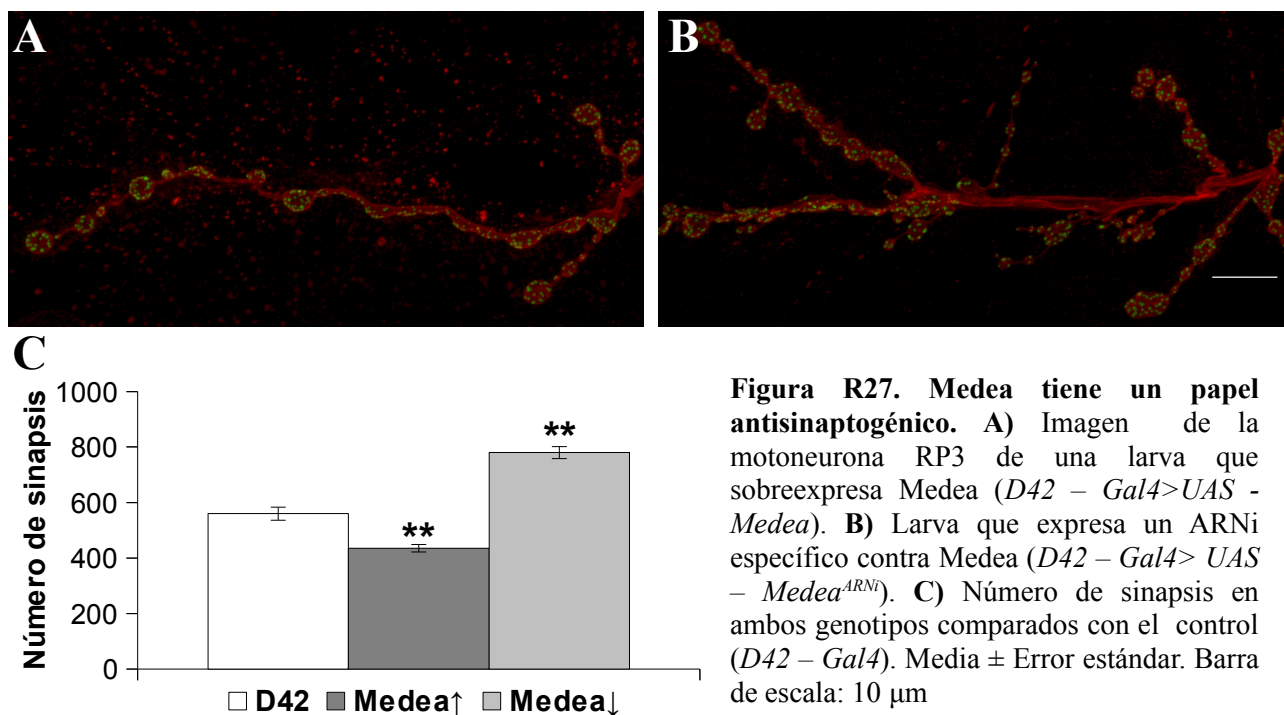
**Figura R26. Jun y Fos cooperan en la formación de nuevas sinapsis.** En la gráfica se muestra el número de sinapsis en el control (*D42 - Gal4*) y en individuos que sobreexpresan Jun y el dominante negativo de Fos (*D42 - Gal4 > UAS - Jun/UAS - Fos<sup>DN</sup>*). Fos<sup>DN</sup> anula la sinaptogénesis de Jun. Media ± Error estándar.

#### 2.4.2. Mad y Medea.

*Mother against Dpp* (Mad) y Medea son necesarios en el desarrollo embrionario así como en la formación de los discos imaginales (Hudson et al., 1998; Raftery et al., 1995). Mad es homólogo de R – Smad en mamíferos y puede ser fosforilado por los receptores de tipo BMP (revisado en Raftery et al., 1999). Por su parte, Medea es homóloga de Smad 4 de humanos (Hudson et al., 1998), se une directamente al ADN y, asociado a Mad, regula la transcripción de genes (revisado en Raftery et al., 1999). En la NMJ, Medea es regulada negativamente por Hiw. La E3 ubiquitina ligasa se une al C – terminal de Medea provocando su degradación y evitando el sobrecrecimiento de la motoneurona (McCabe et al., 2004, revisado en Liebl, 2006). Por su parte, Mad es regulado, mediante fosforilación, por Wit en la NMJ. En los mutantes de este receptor, la señal de Mad fosforilada en el SNC desaparece completamente (Marqués et al., 2002). Esto es debido a que los receptores de tipo I no podrían formar dímeros con Wit y, por tanto, no fosforilarían a Mad. Por el contrario, en el resto de embrión la señal permanece intacta, ya que esta proteína es fosforilada por el receptor principal de Dpp, Punt (Marqués et al., 2002; revisado en Raftery et al., 1999).

Debido a la relación de estas dos proteínas con Wit, Gbb y Hiw, se analizó el efecto en el número de sinapsis cuando los niveles de Medea son alterados. En la **Figura R27**, se muestran las imágenes de la sobreexpresión de Medea (*D42 - Gal4 > UAS - Medea*; **Fig. R27A**) y la utilización de un ARNi específico contra Medea (*D42 - Gal4 > UAS - Medea<sup>ARNi</sup>*; **Fig. R27B**). La regulación

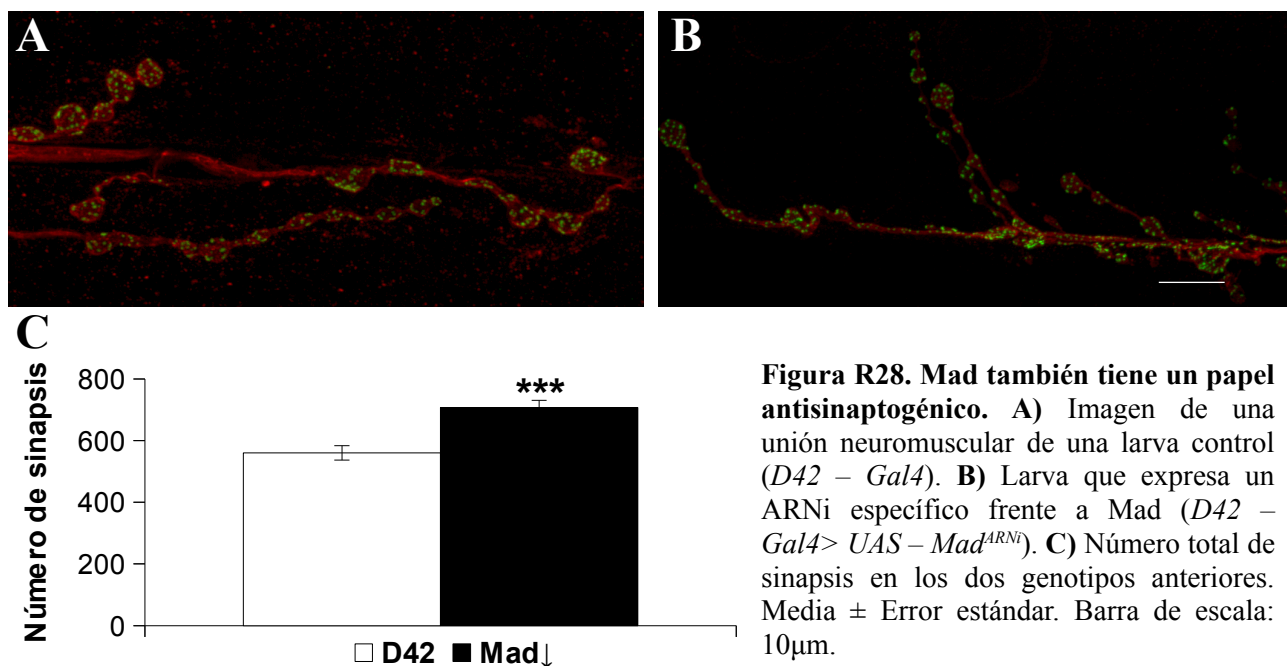
al alza de Medea da lugar a una disminución significativa en el número de sinapsis respecto de su control ( $435 \pm 14$ ,  $n=8$  frente a  $D42 - Gal4$ :  $560 \pm 24$ ,  $n=10$ ,  $p=0,0011$ ; **Fig. R27C**). Por el contrario, la bajada en la cantidad de Medea causa un aumento significativo en la sinaptogénesis ( $780 \pm 22$ ,  $n=9$ ,  $p=0,0021$ ) y parece aumentar en el número de botones y ramificaciones (**Fig. R27B**). Estos datos sugieren que la función normal de Medea es antisinaptogénica.



El fenotipo de Mad en la sinaptogénesis también fue analizado. En este caso, se estudió la disminución de la cantidad de Mad mediante un ARNi específico ( $D42 - Gal4 > UAS - Mad^{ARNi}$ ). Este ARNi, al igual que el de Medea, es letal cuando se expresa en el individuo completo ( $LL7 - Gal4 > UAS - Mad^{ARNi}$ ). Como se observa en la **Figura R28B**, el número de sinapsis correlaciona de manera inversa a la cantidad de Mad, es decir, al reducir Mad aumenta la formación de sinapsis ( $707 \pm 24$ ,  $n=10$ ;  $p=0,0003$ ; **Fig. R28C**). Este resultado, junto con los de Medea (**Fig. R27**), demuestra que este complejo de transcripción es antisinaptogénico al contrario que el formado por Jun y Fos (**Fig. R24 – 26**).

Por último, en un intento de averiguar si el efecto antisinaptogénico de Mad y Medea se relaciona quizás con una retroalimentación negativa en la transcripción del receptor (Wit), analizamos mediante QPCR la cantidad de Wit cuando se sobreexpresa Mad o Medea en el sistema nervioso ( $elav - Gal4 > UAS - Mad$  y  $elav - Gal4 > UAS - Medea$ , respectivamente). En ambos

casos, la transcripción de Wit no se vio afectada (dato no mostrado).



A continuación, se muestra una tabla resumen de todas las proteínas que tienen un papel en la sinaptogénesis analizadas en esta Tesis, su efecto en el número de sinapsis al ser hipo – o hiperexpresadas así como su localización (presináptica o postsináptica) (**Tabla R2**).

**Tabla R2.** Proteínas de la vía sinaptogénica dependiente de PI3K y su efecto en las sinapsis.

Proteína	Modificación	Sinapsis	Región
<b>Gbb</b>	↑ ↓	↑ ↓	Postsináptica
<b>Wit</b>	↑ ↓	↑ ↓	Presináptica
<b>PI3K</b>	↑ ↓	↑ ↓	Presináptica
<b>AKT</b>	↑ ↓	↑ ↓	Presináptica
<b>GSK3</b>	↑ ↓	↓ ↑	Presináptica
<b>Highwire</b>	↑ ↓	↑ ↓	Presináptica
<b>Ras</b>	↑ ↓	↑ =	Presináptica
<b>Wallenda</b>	↑	↑	Presináptica
<b>Hemipterous</b>	↑ ↓	↑/= ↓	Presináptica
<b>Basket</b>	↑ ↓	↑ =	Presináptica
<b>Fos</b>	↑ ↓	= ↓	Presináptica
<b>Jun</b>	↑ ↓	↑ =	Presináptica
<b>Mad</b>	↓	↑	Presináptica
<b>Medea</b>	↑ ↓	↓ ↑	Presináptica
<b>Heartless</b>	↓	↑	Postsináptica
<b>Breathless</b>	↓	↑	Postsináptica

### 3. EFECTO DE PI3K EN LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO Y OTRAS PROTEÍNAS POSTSINÁPTICAS.

#### 3.1. PI3K CONTROLA EL NÚMERO DE PSDS EN LA NMJ.

La sobreexpresión presináptica de PI3K en la NMJ de *Drosophila* da lugar a un aumento en el número de sinapsis (Martín – Peña et al, 2006; Jordán – Álvarez et al, 2012). En este capítulo, decidimos investigar si los receptores de glutamato postsinápticos también se modifican cuando se manipulan experimentalmente los niveles presinápticos de PI3K. Los receptores de glutamato se localizan en las densidades postsinápticas (PSDs), unas estructuras necesarias para la estabilización y regulación de los receptores de neurotransmisores (Renner et al, 2008). El número de sinapsis se contó como a lo largo de toda la tesis empleando el anticuerpo nc82, un anticuerpo  $\alpha$  – Brp dirigido contra la región N – terminal de Brp y  $\alpha$  – HRP (ver Materiales y Métodos). Las PSDs fueron teñidas para su posterior análisis utilizando anticuerpos contra varias subunidades de los receptores A, B, C y D (GluRIIA – GluRIID) (DiAntonio, 2006).

El número de sinapsis y PSDs varía en función de los niveles de PI3K (Martín – Peña et al, 2006; Jordán – Álvarez et al, 2012). La sobreexpresión de PI3K (*D42 – Gal4>UAS – PI3K*) da lugar a un aumento en el número de sinapsis ( $718 \pm 25$ ,  $n=10$ ; **Tabla R3**) y en el número de botones (**Tabla R5**) respecto del control (*D42 – Gal4*) ( $493 \pm 27$ ,  $n=12$ ; **Fig. R29A – B, F**) así como el número de PSDs:  $32 \pm 7\%$  en GluRIIA,  $40 \pm 10\%$  en GluRIIB,  $33 \pm 6$  en GluRIIC y  $43 \pm 4\%$  en GluRIID (**Fig. R29C – D, G** y **tabla R2**). Sin embargo, ni el tamaño de los botones (**Tabla R5**) ni de las PSDs varía entre ambos genotipos (**Tabla R4**). Por otro lado, si se disminuyen los niveles de PI3K empleando un PI3K<sup>DN</sup> se reducen significativamente las sinapsis (*D42 – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*:  $400 \pm 25$ ,  $n=9$ ) en comparación con su control (*D42 – Gal4*:  $548 \pm 38$ ,  $n=9$ ,  $p=0,0039$ ; **Fig. R30C**). Además, el número de PSDs disminuye en las larvas PI3K<sup>DN</sup> ( $477 \pm 40$ ,  $n=10$ ) frente a su control ( $618 \pm 48$ ,  $n=9$ ,  $p=0,0369$ ) de forma similar a la reducción en el número de sinapsis (**Fig. R30D**).

**Tabla R3.** Número de sinapsis y densidades postsinápticas en individuos control y que sobreexpresan PI3K en la NMJ de las fibras 6 y 7. \* =  $p < 0,05$  o mejor.

	Sinapsis (nc82)	Sinapsis (Brp)	PSDs (IIA)	PSDs (IIB)	PSDs (IIC)	PSDs (IID)
<b>D42</b>	493 ± 27	567 ± 75	552 ± 34	502 ± 49	567 ± 29	578 ± 33
<b>PI3K</b>	718 ± 25	903 ± 50	729 ± 41	703 ± 49	753 ± 34	826 ± 25
<b>Diferencia</b>	Δ1.46*	Δ1.59*	Δ1.32*	Δ1.40*	Δ1.33*	Δ1.43*

**Tabla R4.** Tamaño de las densidades postsinápticas en individuos control y que sobreexpresan PI3K en la NMJ de las fibras 6 y 7.

	N	Tamaño (Área, $\mu\text{m}^2$ )
<b>D42</b>	10	0.23±0.02
<b>PI3K</b>	9	0.21±0.01

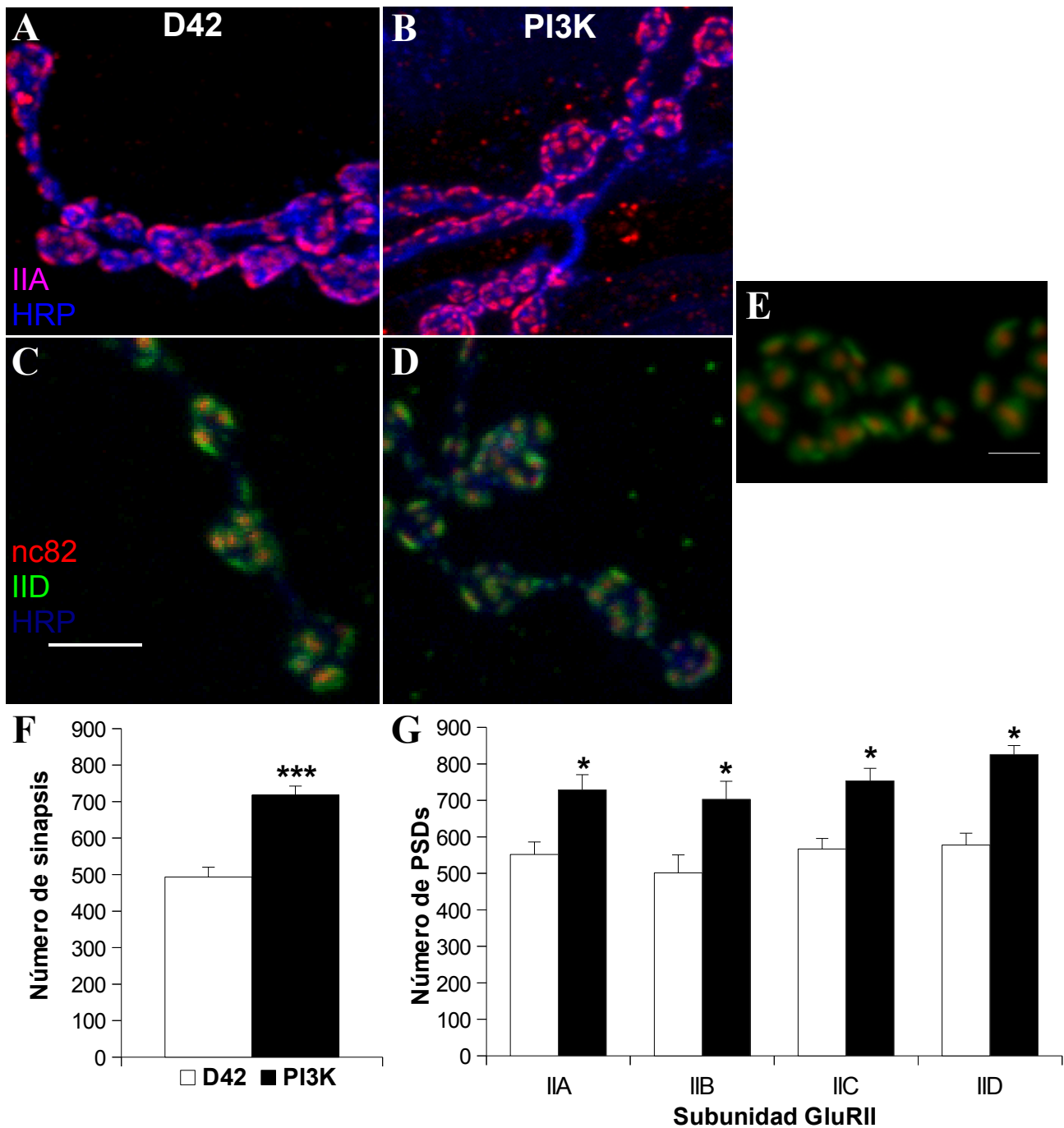
**Tabla R5.** Número de botones y su tamaño medio en larvas control y larvas que sobreexpresan PI3K en la motoneurona RP3. \* =  $p < 0,05$  o mejor.

	N	Número de botones por NMJ	Tamaño de los botones ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>D42</b>	8	83±5	4,4±0,2
<b>PI3K</b>	8	108±6	4.6±0,2
<b>Diferencia</b>		Δ1,30*	Δ1,05

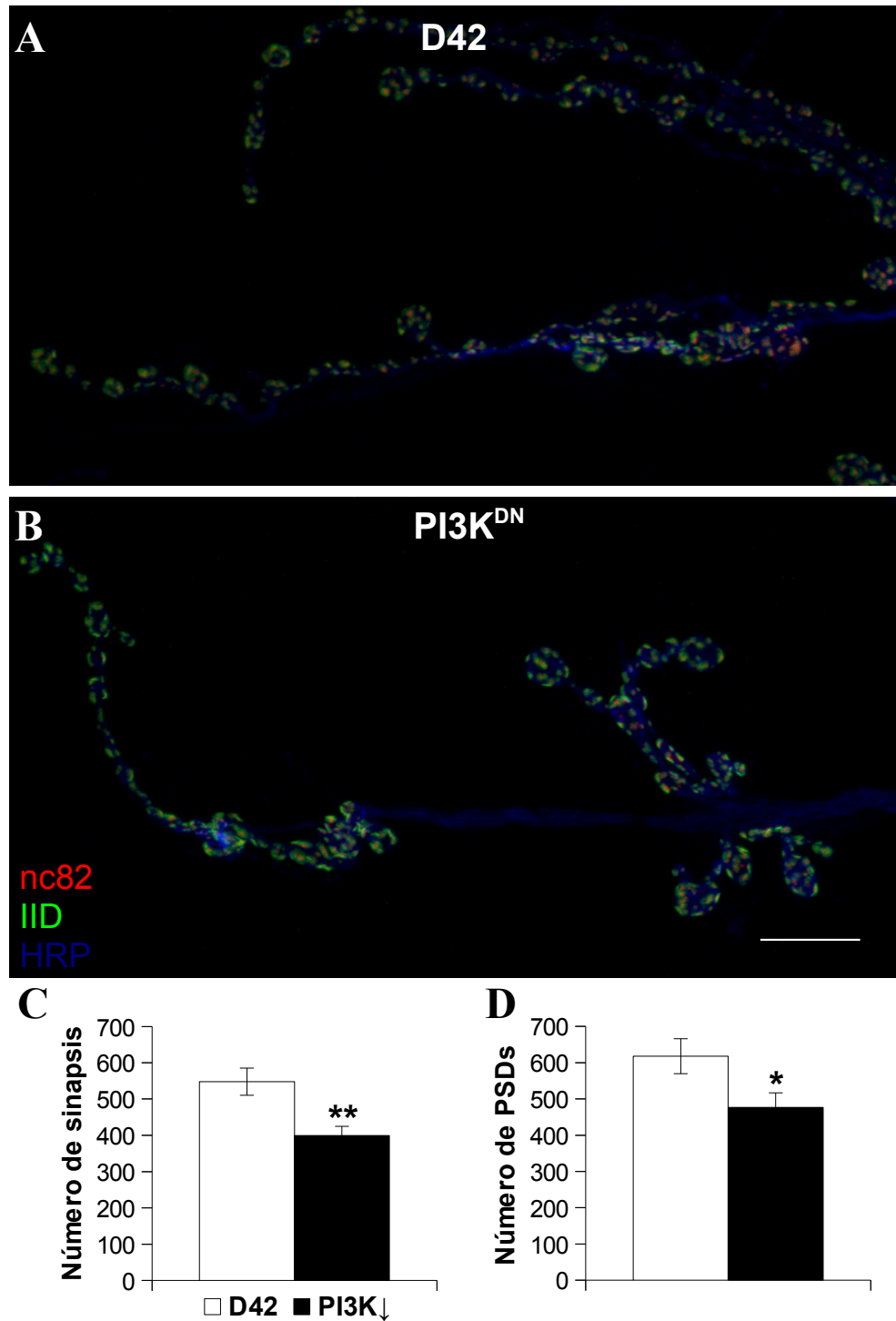
### 3.2. PI3K VARÍA LA EXPRESIÓN DE GLURIIA.

Decidimos comprobar si el aumento en el número de PSDs se debía a un aumento en la cantidad de proteína de los receptores y para ello se cuantificó la expresión de GluRIIA mediante WB. Sólo se analizó GluRIIA porque los anticuerpos contra los otras subunidades no funcionan en WB. Además, los niveles de GluRIIA son mayores que los de otras subunidades en las PSDs en formación (Schmid et al, 2008). En estos experimentos, empleamos paredes larvarias de LIII que expresan el Gal4 neuronal *elav – Gal4* (control), la sobreexpresión de PI3K (*elav – Gal4 > UAS – PI3K*) y PI3K<sup>DN</sup> (*elav – Gal4 > UAS – PI3K<sup>DN</sup>*) (**Fig. R31A**). Además, se expresó un ARNi frente a

GluRIIA (*UAS – GluRIIA<sup>ARNi</sup>*) para comprobar la especificidad del anticuerpo (dato no mostrado).



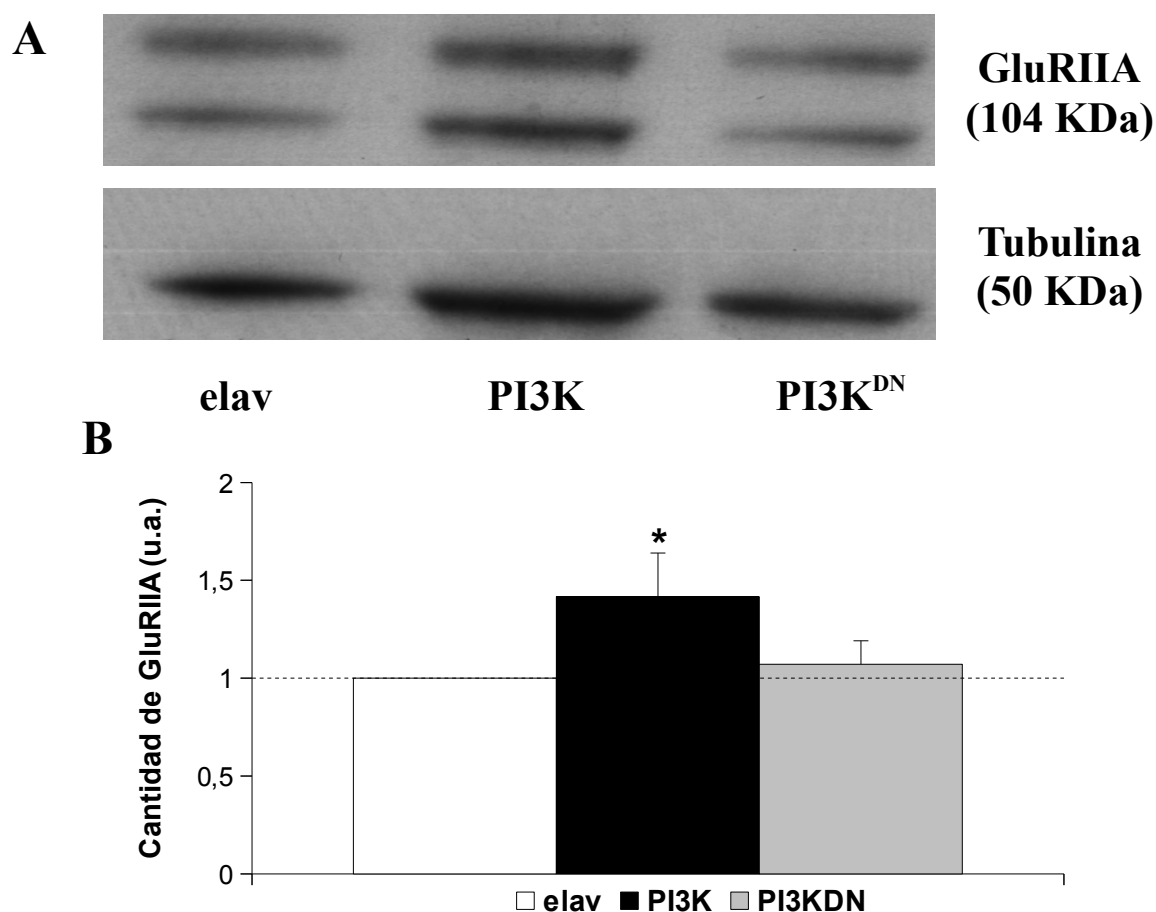
**Figura R29: Efecto de la sobreexpresión presináptica de PI3K en los GluRII.** Imágenes de confocal mostrando una inmunotinción doble contra  $\alpha$ -GluRIIA (rojo) y  $\alpha$ -HRP (azul) para visualizar y contar las PSDs en la NMJ de **A)** control *D42-Gal4* y **B)** *D42-GAL4>UAS-PI3K*. Imágenes control *D42-Gal4* **C)** y *D42-GAL4>UAS-PI3K* **D)** de las motoneuronas teñidas con nc82 (rojo), GluRIID (verde) y  $\alpha$ -HRP (azul) que permite el conteo simultáneo de las sinapsis y las PSDs. **E)** Aumento de un botón donde puede observarse la oposición entre el marcaje presináptico (nc82) y el postsináptico (GluRIID). **F)** Histograma mostrando el número de sinapsis en larvas control y experimentales. La sobreexpresión de PI3K aumenta de forma significativa el número de sinapsis. **G)** Gráfica del número total de de PSDs utilizando anticuerpos contra cada una de las GluRII (A – D). Existe un aumento en el número de PSDs en los individuos PI3K. No existe diferencias significativas si se compara el número de PSDs detectadas con los diferentes anticuerpos GluRII ni en los controles ni en los experimentales. Barra de escala: **A-D)**, 3  $\mu$ m; **E)**, 1  $\mu$ m.



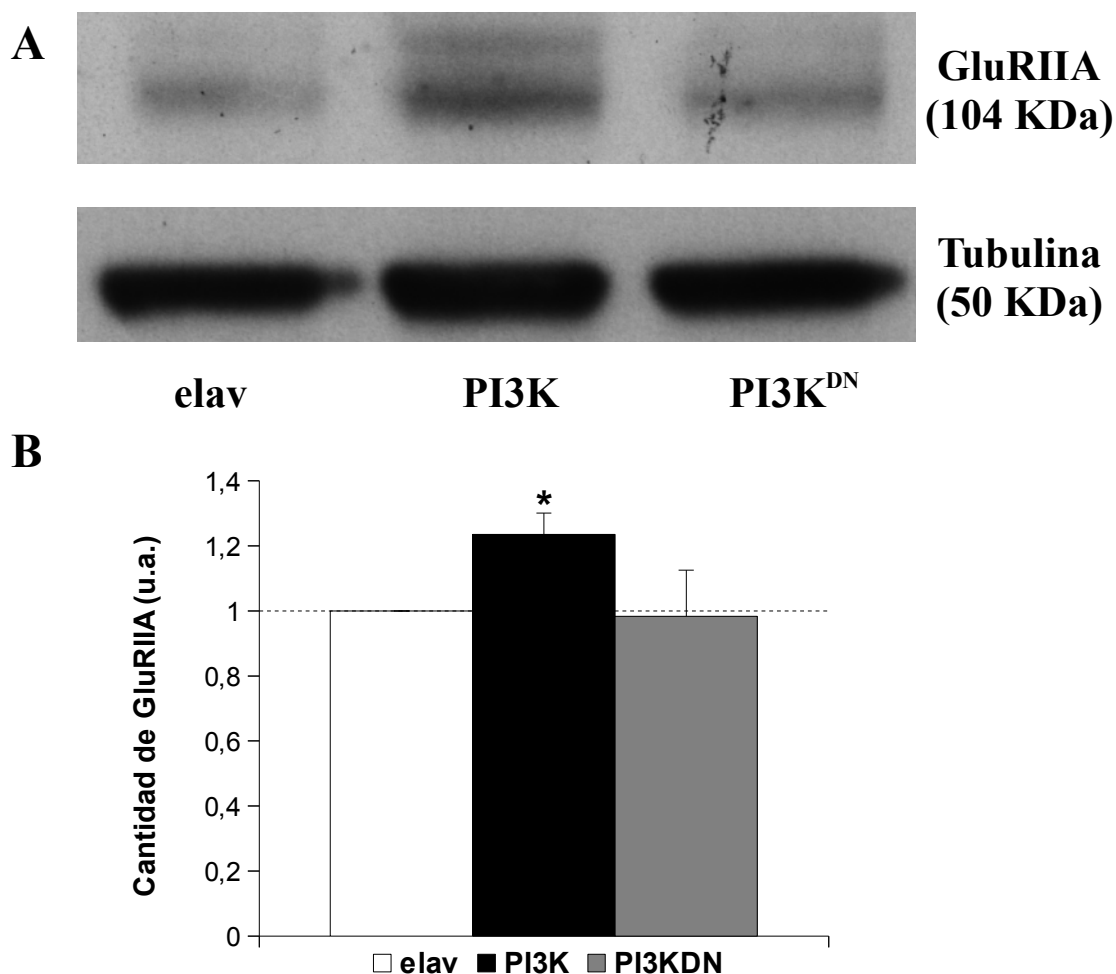
**Figura R30: La expresión presináptica de PI3K<sup>DN</sup> afecta a los GluRII.** Imágenes mostrando una triple inmunotinción con nc82 (rojo), GluRIID (verde) y  $\alpha$ -HRP (azul) para teñir y cuantificar las sinapsis y las PSDs en las fibras 6/7 de **A)** control *D42-Gal4* y **B)** *D42-GAL>UAS-PI3K<sup>DN</sup>*. **C)** Cuantificación del número de sinapsis en las larvas control y experimentales. **D)** Gráfica con el número total de PSDs cuantificadas utilizando el anticuerpo GluRIID en los mismos genotipos. Existe un descenso del número de PSDs y sinapsis cuando se expresa el PI3K<sup>DN</sup> presinápticamente. PI3K↓=PI3K<sup>DN</sup>. Barra de escala en **B)**, 10  $\mu$ m.



Se observó que la sobreexpresión de PI3K da lugar a un aumento significativo de  $42 \pm 20\%$  en los niveles de GluRIIA frente a su control ( $n=5$  WB independientes, 3 larvas por carril;  $p < 0.05$ ). Sin embargo, el dominante negativo ( $PI3K^{DN}$ ) no parece afectar a la cantidad de GluRIIA (**Fig. R31A – B**). Por otro lado, analizamos los mismos genotipos empleando cerebros larvarios (**Fig. R32**) reduciendo en este caso un  $24 \pm 6\%$  los niveles de GluRIIA en los individuos  $PI3K$  ( $elav - Gal4 > UAS - PI3K$ ;  $p < 0,05$ ) y sin diferencias significativas en el caso de  $PI3K^{DN}$  ( $elav - Gal4 > UAS - PI3K^{DN}$ ). Estos datos demuestran que la sobreexpresión presináptica de PI3K es capaz de modificar los niveles de GluRIIA en la región postsináptica (Jordán – Álvarez et al, 2012).



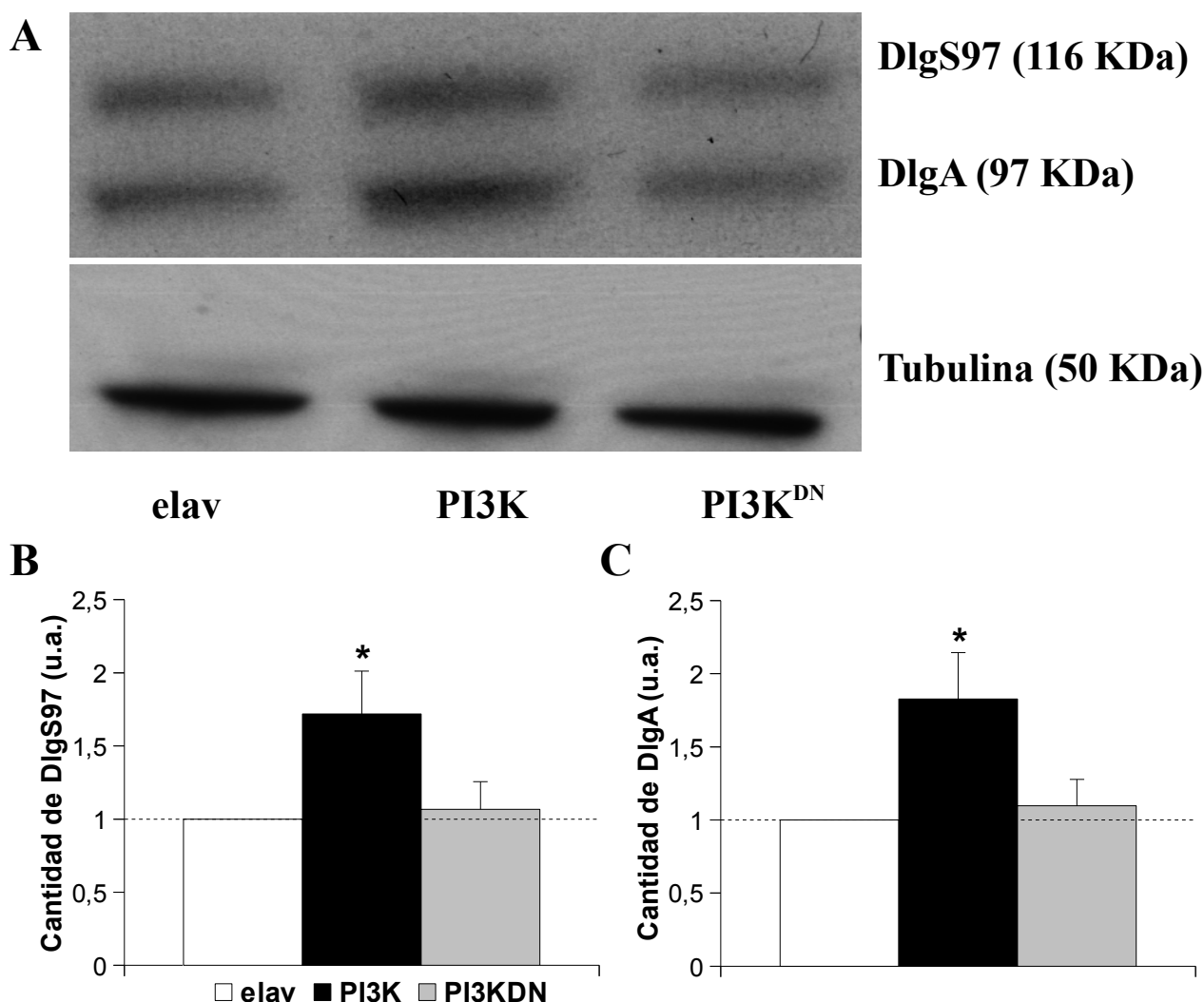
**Figura R31: La regulación de los niveles de GluRIIA es dependiente de PI3K.** **A)** Imagen representativa de un WB mostrando los niveles de *elav - Gal4* (control), *elav - Gal4 > UAS - PI3K* y *elav - Gal4 > UAS - PI3K<sup>DN</sup>* en paredes larvarias. Este anticuerpo GluRIIA reconoce dos bandas de las cuales la inferior se corresponde con el peso molecular estimado (104 KDa). **B)** Gráfica de los niveles de GluRIIA cuantificados respecto al control y normalizados con tubulina en cada uno de los genotipos. La cantidad de GluRIIA aumenta significativamente en los animales  $PI3K$  pero no existe diferencias cuando se expresa el dominante negativo de  $PI3K$  ( $PI3K^{DN}$ ). u.a.: unidades arbitrarias.



**Figure R32: Regulación de los niveles de GluRIIA dependiente de PI3K en el SNC.** A) Autoradiografía que muestra los niveles de GluRIIA en cerebros larvarios de controles (*elav – Gal4*), *elav – Gal4>UAS – PI3K* y *elav – Gal4/UAS – PI3K<sup>DN</sup>*. B) Niveles de GluRIIA normalizados respecto a la tubulina y relativizados al control en los tres genotipos anteriores. Se aprecia un incremento de los niveles de GluRIIA en los cerebros que sobreexpresan PI3K.u.a.: unidades arbitrarias.

### 3.3. PI3K MODIFICA LA EXPRESIÓN DE DLG.

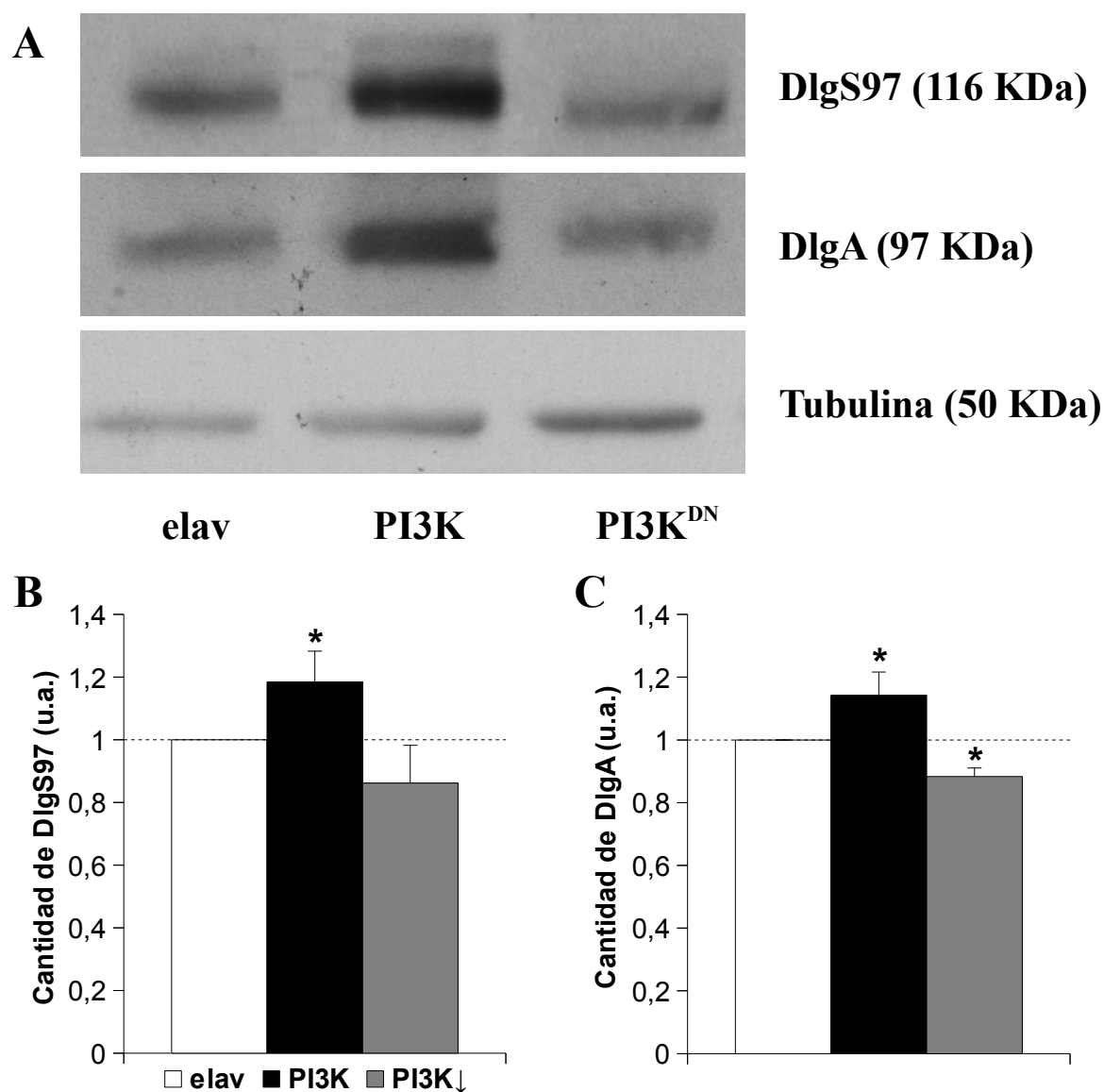
*Discs large* (Dlg) es una proteína postsináptica que está implicada en la incorporación de los receptores de tipo GluRIIB pero no GluRIIA en la NMJ de *Drosophila* (Chen y Featherstone, 2005; Thomas et al, 2010). Como su homólogo en mamíferos, Dlg, es una proteína fundamental para la arquitectura de las sinapsis excitatorias (Montgomery et al, 2004; Parnas et al, 2001). En este estudio, analizamos la cantidad de Dlg mediante un anticuerpo específico que reconoce las dos isoformas de Dlg descritas en la NMJ: DlgA y DlgS97 (Mendoza – Topaz et al, 2008) (**Fig. R33A**) en paredes larvarias de LIII como en el apartado anterior.



**Figura R33: Efecto de PI3K en los niveles de las isoformas de Dlg.** **A)** Western Blot donde se enseñan los niveles de la proteína Dlg en paredes larvianas de control *elav – Gal4*, *elav – Gal4>UAS – PI3K* y *elav – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*. El anticuerpos reconoce dos isoformas de Dlg: DlgS97 (116KDa) y DlgA (97 KDa). **B)** Histograma mostrando la cantidad de DlgS97 en los 3 genotipos. **C)** Gráfica de los niveles DlgA en los mismos genotipos. Sólo se aprecian cambios significativos con la sobreexpresión de PI3K.

La sobreexpresión de PI3K (*elav – Gal4>UAS – PI3K*) aumenta  $83\pm 31\%$  los niveles de la isoforma DlgA (**Fig. R33B**) y  $72\pm 29\%$  la isoforma DlgS97 (**Fig. R33C**) ( $n=5$  WB independientes, 3 larvas por carril;  $p<0,05$ ). Por el contrario, la disminución de PI3K (*elav – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*) no varía la cantidad de ninguna de las isoformas (**Fig. R33B – C**). Estos datos fueron confirmados en cerebros larvianos de los mismos genotipos. En este caso, DlgA aumenta un  $14\pm 7\%$  respecto al control y DlgS97 un  $15\pm 7\%$  (**Fig. R34B – C**;  $p<0,05$ ). Tampoco se observan diferencias significativas con PI3K<sup>DN</sup> (*elav – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*). Como control adicional de la especificidad del anticuerpo frente a Dlg se empleó un ARNi (*UAS – Dlg<sup>ARNi</sup>*) donde se reducían ambas isoformas un 20% (dato no mostrado). **Los resultados demuestran que, al igual que con**

**GluRIIA, la sobreexpresión presináptica de PI3K es capaz de variar los niveles de Dlg en las dos isoformas postsinápticas conocidas, DlgA y DlgS97 (Jordán – Álvarez et al, 2012).**

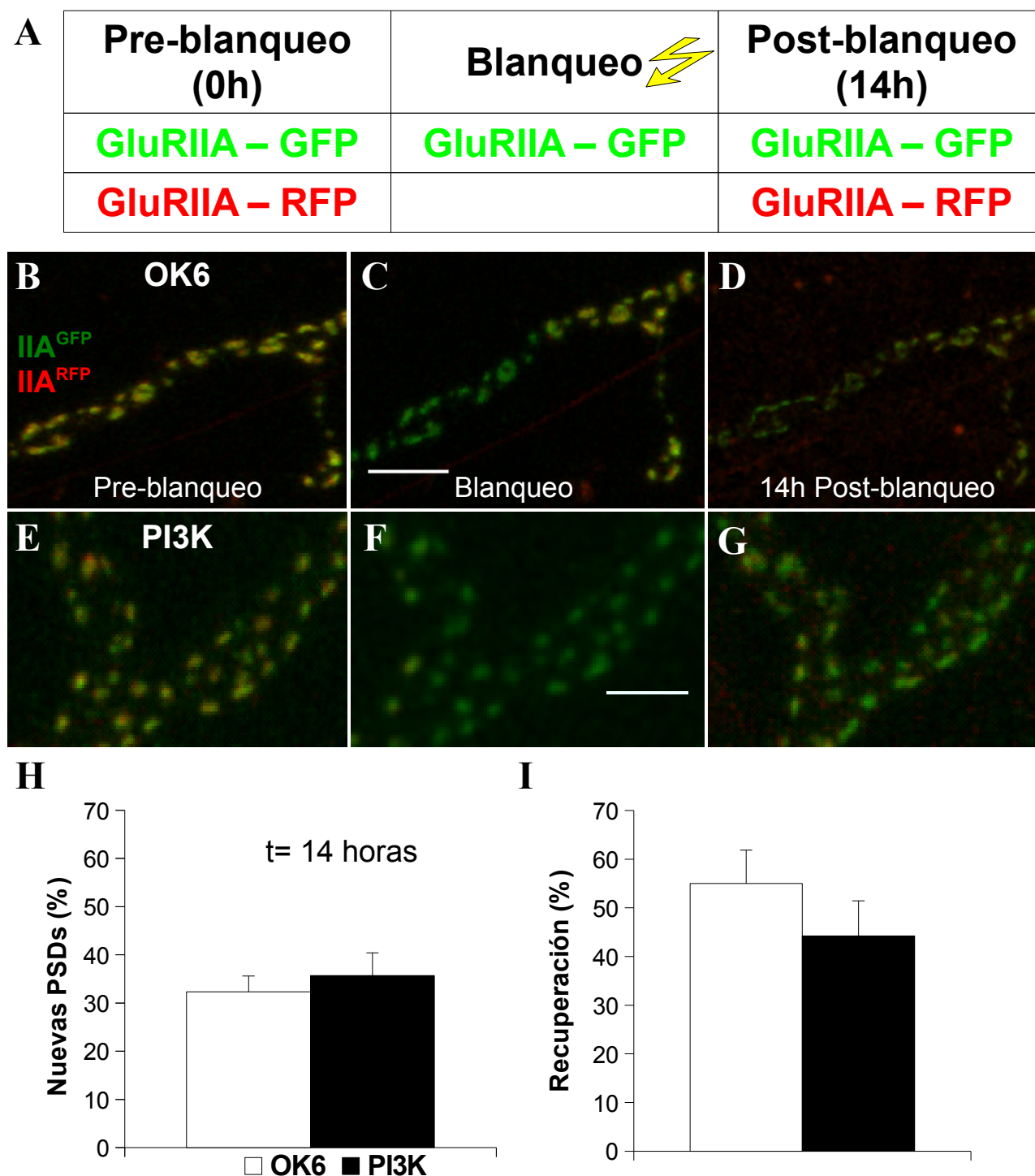


**Figura R34: Efecto de PI3K en los niveles de Dlg en SNC. A)** Autoradiografía de un WB mostrando los niveles de la proteína Dlg en cerebros larvarios de controles (*elav – Gal4*), *elav – Gal4>UAS – PI3K* y *elav – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*. El anticuerpo reconoce dos isoformas de Dlg: DlgS97 (116KDa) y DlgA (97 KDa). **B)** Histograma de la cantidad de DlgS97 en los tres genotipos. La cantidad de DlgS97 aumenta en los cerebros PI3K. **C)** Gráfica mostrando los niveles de DlgA en los mismos genotipos. La cantidad DlgA varía en relación a los niveles de PI3K. La cantidad de ambas isoformas de Dlg fue normalizada respecto a la tubulina en todos los genotipos y relativizada respecto al control.

### 3.4. LA INCORPORACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE GLURII EN LAS PSDS ES INDEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE PI3K.

Decidimos estudiar si los niveles de PI3K influían en la dinámica de formación de los GluRIIs en la PSD. Para ello, se utilizó la técnica de FRAP (Recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo) en la NMJ larvaria. El FRAP ha revelado en estudios previos (Rasse et al, 2005; Schmid et al, 2008; Oswald y Sigrist, 2009) que la incorporación de GluRIIA está directamente relacionada con la formación y el crecimiento de la PSD. Hemos utilizado la subunidad GluRIIA marcada con RFP y GFP (ver Materiales y Métodos) dejando el canal verde como control interno y fotoblanqueando el rojo. De esta forma, se cuantificó la incorporación de los receptores de glutamato a la PSD.

Se fotografiaron uniones neuromusculares a tres tiempos diferentes: Pre – blanqueo (0h), Blanqueo (del canal rojo) y post – blanqueo (14 horas después). Estas mediciones se efectuaron en animales control (*OK6 – Gal4*) y experimentales (*OK6 – Gal4>UAS – PI3K*) (**Fig. R35A – G**). A las 14 horas, se contó el número de nuevas PSDs que se habían formado en la fibra muscular larvaria 27. Nuestros datos no indican diferencias significativas entre los controles ( $32 \pm 3\%$ ,  $n=10$ ) y las larvas PI3K ( $36 \pm 5\%$ ,  $n=12$ ;  $p>0,05$ ) (**Fig. R35H**). Además, se calculó el porcentaje de recuperación de la fluorescencia a las 14 horas como la diferencia de intensidad, en la señal GluRIIA<sup>RFP</sup> entre el área fotoblanqueada frente a áreas adyacentes no blanqueadas (Rasse et al, 2005; Schmid et al, 2008). No existen diferencias significativas entre ambos genotipos (control:  $52 \pm 12\%$ ; PI3K  $39 \pm 6\%$ ). En su conjunto, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de PI3K no altera la dinámica de incorporación de los GluRIIs a las PSDs en formación. Es decir, **PI3K promueve la formación de sinapsis y este proceso se realiza con la tasa normal de incorporación de sus componentes pre- y postsinápticos, al menos para la subunidad GluRIIA.**



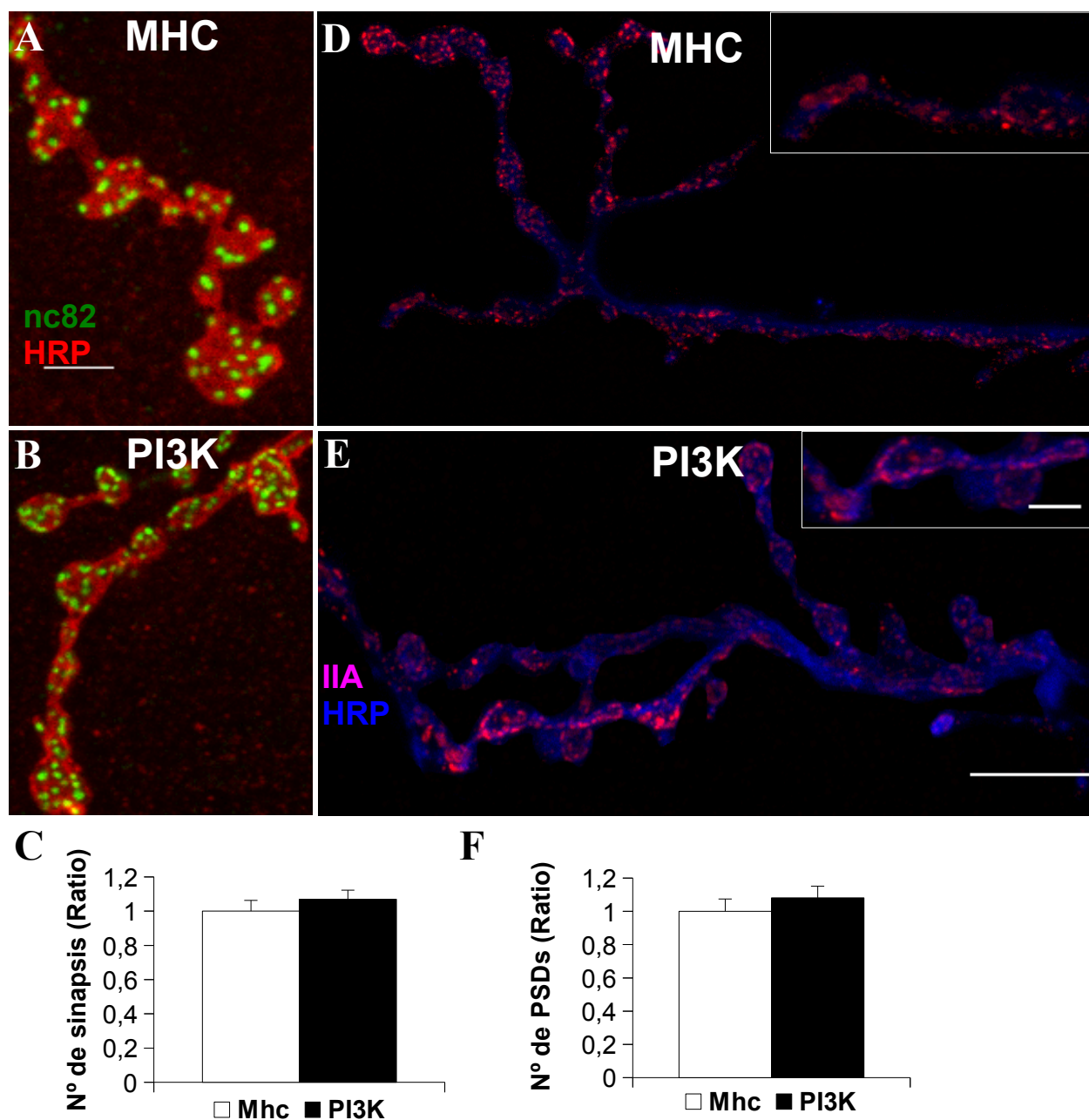
**Figura R35: Papel de PI3K en la dinámica de GluRIIA.** A) En los experimentos de FRAP, se utilizaron larvas que expresaban de forma endógena GluRIIA marcado con RFP (rojo) y GFP (verde). B – D) Imágenes mostrando (B) pre – blanqueo (C) justo después del blanqueo de la señal RFP y (D) 14h post – blanqueo en una NMJ control (*OK6 – Gal4*). E – G) Fotografías equivalentes de un individuo experimental (*OK6 – Gal4 > UAS – PI3K*). H) La entrada de GluRIIA<sup>RFP</sup> en PSDs individuales después del fotoblanqueo así como la señal GluRIIA<sup>GFP</sup> permite cuantificar las formación de nuevas PSDs en 14h representadas como porcentaje de incremento en esta gráfica. I) Histograma mostrando el porcentaje de recuperación de la fluorescencia calculado como la diferencia entre la región blanqueada y las adyacentes no afectadas en la misma NMJ. Barra de escala: B – D), 5µm; E – G), 3µm.

### 3.5. LA EXPRESIÓN POSTSINÁPTICA DE PI3K NO MODIFICA EL NÚMERO DE SINAPSIS NI EL DE PSDS.

En experimentos previos, mostramos que la sobreexpresión de PI3K en la motoneurona causa la formación de nuevas sinapsis. Decidimos estudiar si el efecto sinaptogénico de PI3K podía ser sólo presináptico, postsináptico o ambos a la vez. Se empleó el *Mhc – Gal4* para expresar PI3K en la región postsináptica (músculo en este caso, Schuster et al., 1996) sin encontrar diferencias significativas en el número de sinapsis entre los individuos PI3K (*Mhc – Gal4>UAS – PI3K*,  $684\pm33$ ,  $n=10$ ) respecto de sus controles (*Mhc – Gal4*,  $639\pm40$ ,  $n=11$ ;  $p=0,4013$ ) (**Fig. R36C**). La morfología de la NMJ es similar en ambos casos, no existiendo diferencias en el número de botones totales ni en los botones satélite (**Tabla R6**). Sin embargo, cuando PI3K es expresada presinápticamente (Ej.: *D42 – Gal4> UAS – PI3K*) se produce un aumento de las ramificaciones de la motoneurona (Martín – Peña et al, 2006). Por otro lado, se cuantificó el número de PSDs utilizando anti – GluRIIA y anti – HRP en los mismos genotipos (**Fig 36D – E**), no encontrando diferencias significativas entre las larvas PI3K (*Mhc – Gal4>UAS – PI3K*,  $747\pm48$ ,  $n=8$ ) respecto de sus controles (*Mhc – Gal4*,  $691\pm52$ ,  $n=10$ ;  $p=0,4590$ ). **Nuestros datos demuestran, por tanto, que el efecto sinaptogénico de PI3K es solamente presináptico.**

**Tabla R6.** Número total de botones y porcentaje de botones satélite respecto del total en larvas control y larvas que sobreexpresan PI3K postsinápticamente.

	N	Número de botones	Número de botones satélite	% de botones satélite
<b>Mhc</b>	11	$104\pm10$	$6\pm1$	$5.4\pm0.7$
<b>PI3K</b>	8	$125\pm4$	$8\pm1$	$6.4\pm0.9$



**Figura R36: La expresión de PI3K en la región postsináptica no afecta el número de sinapsis o PSDs.** Imágenes tomadas en el confocal: **A)** larva control (*Mhc – Gal4*) y **B)** *Mhc – Gal4>UAS – PI3K*. En ambos se utilizó el anticuerpo nc82 (verde) y  $\alpha$  – HRP (rojo) para visualizar y cuantificar el número de sinapsis. **C)** La sobreexpresión postsináptica de PI3K no da lugar a cambios en el número de sinapsis respecto a su control. Co – inmunotinción con GluRIIA (rojo) y  $\alpha$  – HRP (azul) en animales control: **D)** *Mhc – Gal4* y **experimentales E)** *Mhc – Gal4>UAS – PI3K*. **F)** PI3K no produce un aumento en el número de PSDs cuando es expresada postsinápticamente en comparación con el control. Barras de escala: **A – B)**, 5  $\mu$ m.; **D – E)**, 10  $\mu$ m.; insertos en **D – E)**, 3  $\mu$ m.

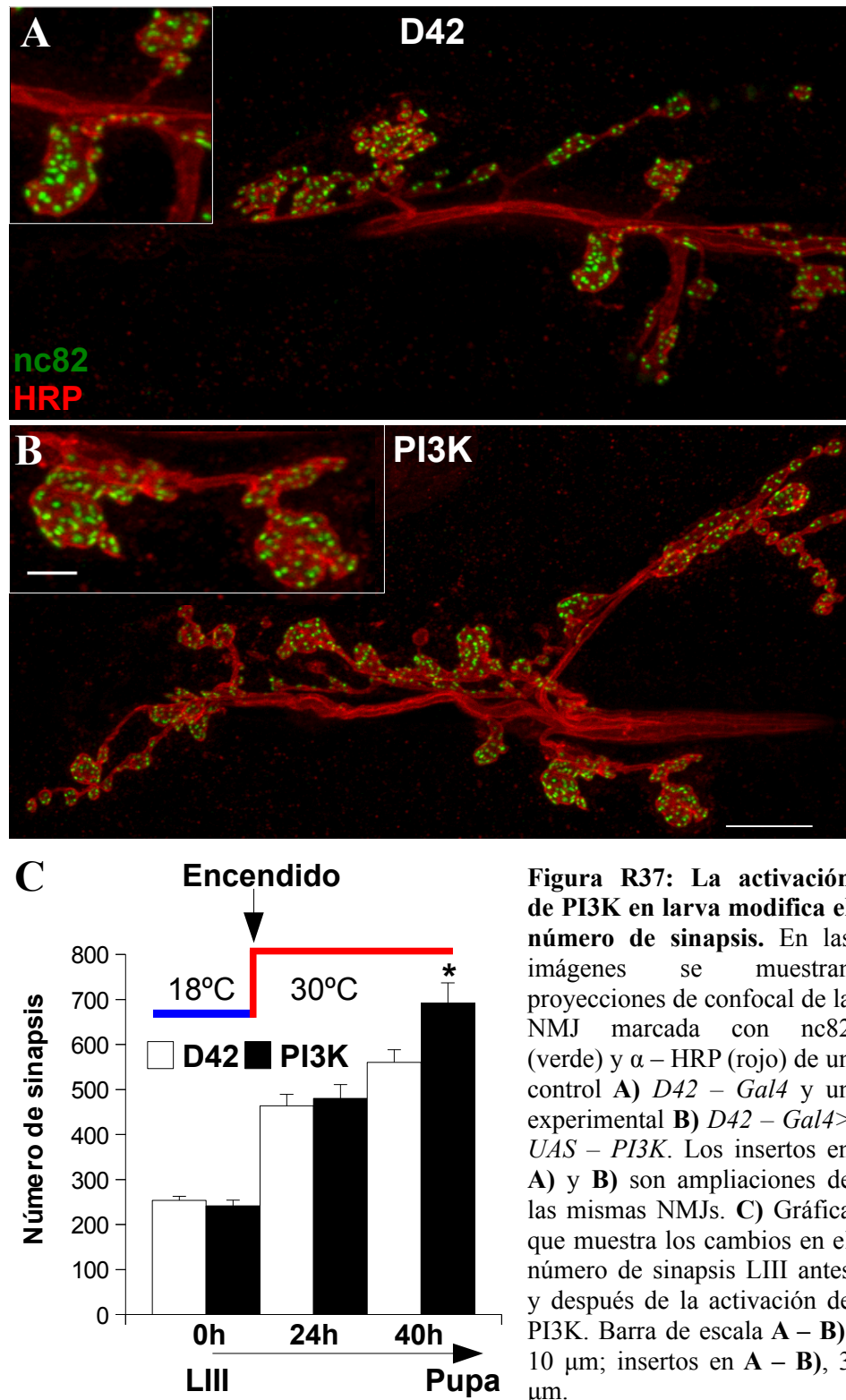


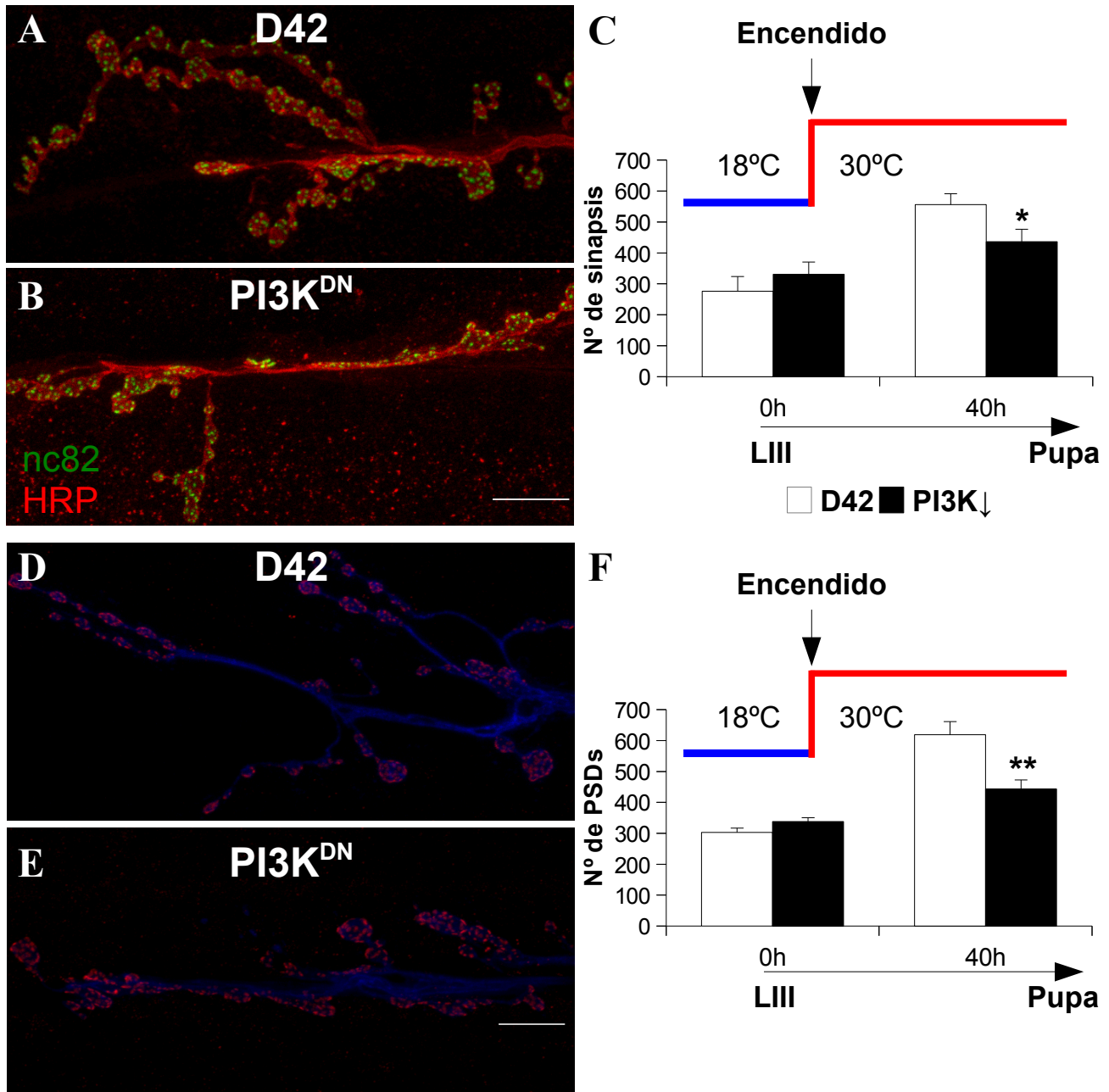
## 4. CONTROL TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE PI3K.

### 4.1. LA ACTIVACIÓN NEURONAL DE PI3K ES NECESARIA Y SUFICIENTE PARA LA SINAPTOGÉNESIS.

En los experimentos previos, se ha regulado la actividad de PI3K de forma crónica durante todo el desarrollo embrionario y larvario. Para averiguar si la sinaptogénesis de PI3K es un efecto del desarrollo o no, decidimos inducir la expresión de esta quinasa solamente en el estadio de LIII. Se empleó el inhibidor termosensible del *Gal4*, *Gal80<sup>ts</sup>* (McGuire et al., 2003). El desarrollo se mantuvo a 18°C hasta LIII temprana, en ese momento, se cambió la temperatura a 30°C para permitir la expresión de PI3K en la NMJ. El sistema necesita un mínimo de 6 horas para permitir la expresión proteica (detectado mediante un *CD8 – GFP*, dato no mostrado).

Los datos se obtuvieron en tres momentos del desarrollo: antes de la activación de PI3K (0h), 24 horas después de cambiar la temperatura (24h) y 40 horas después de ese cambio (40h). Se utilizaron los anticuerpos nc82 y anti – HRP para visualizar y contar el número de sinapsis en la NMJ de los controles (*D42 – Gal4*) y en individuos PI3K (*D42 – Gal4>UAS – PI3K*) (**Fig. R37A – B**). 24 horas después de “encender” PI3K, ambos genotipos muestran un aumento en el número de sinapsis (control 83%, n=8 y PI3K 99%, n=9). En este punto, aún no existen diferencias significativas entre ambos (p=0.6954) (**Fig. R37C**). Sin embargo, a las 40h de activación, el número de sinapsis es significativamente diferente en los individuos PI3K (694±43, n=12) frente a los controles (560±27, n=10; p=0,0213) (**Fig. R37C**). Además, realizamos el mismo experimento en larvas que expresaban el dominante negativo de PI3K (*D42 – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>*). En este caso, el número de sinapsis se redujo a las 40h : control (542±35, n=11) y PI3K<sup>DN</sup>(437±40, n=10; p=0,0382) (**Fig. R38A – C**). **Los datos demuestran que PI3K es necesaria y suficiente para inducir sinaptogénesis en la NMJ de LIII** (ver publicación adjunta Jordán – Álvarez et al., 2012). **Estos datos están en concordancia con datos en adultos envejecidos donde el tiempo para formar nuevas sinapsis tras la expresión aguda de PI3K era de 24 horas** (Martín – Peña et al., 2006).





**Figura R38: La activación temporal de PI3K<sup>DN</sup> disminuye el número de sinapsis y PSDs.** Los paneles muestran imágenes de confocal de motoneuronas de **A)** *D42 – Gal4* y **B)** *D42 – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>* donde se ha realizado una inmunotinción con nc82 (verde) y  $\alpha$  – HRP (rojo). **C)** Histograma de la cuantificación del número de sinapsis a lo largo del desarrollo de larvas de tercer estadio antes y después de la activación de PI3K. Existen diferencias significativas a las 40h de la expresión de PI3K<sup>DN</sup>. Imágenes de larvas en **D)** *D42 – Gal4* y **E)** *D42 – Gal4>UAS – PI3K<sup>DN</sup>* donde se visualizan los anticuerpos GluRIIA (rojo) y  $\alpha$  – HRP (azul). **F)** Gráfica de la variación en el número de PSDs previa y posteriormente a la activación de PI3K<sup>DN</sup>. Los datos muestran un descenso en el número de PSDs que correlaciona con el descenso en el número de sinapsis **C)**. Barra de escala: **A – D)**, 10  $\mu$ m.

## 4.2. LA EXPRESIÓN NEURONAL DE PI3K ES NECESARIA Y SUFICIENTE PARA INCREMENTAR LAS PSDS DEL LADO POSTSINÁPTICO.

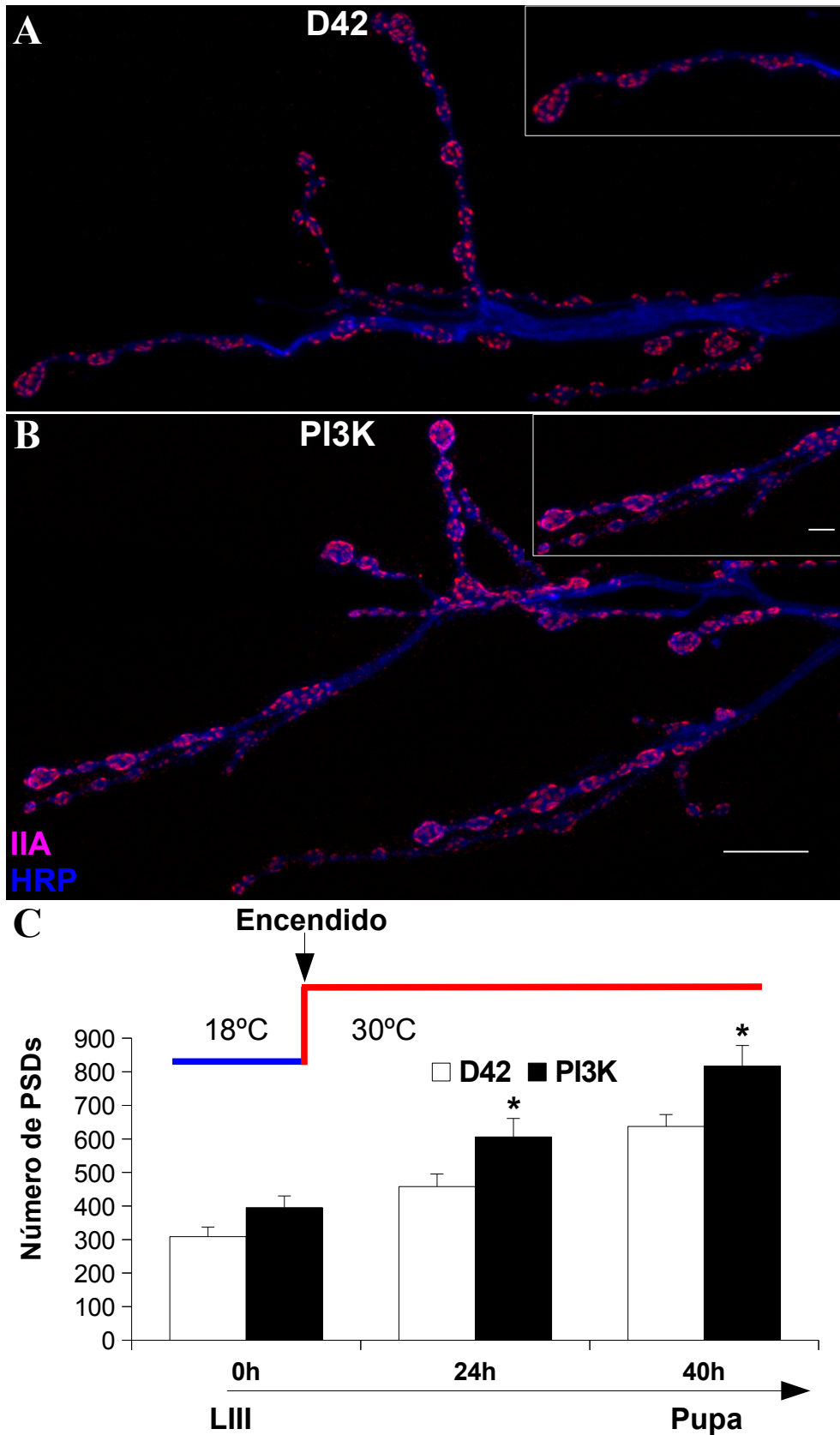
Como se ha descrito anteriormente, la sinaptogénesis dependiente de PI3K correlaciona con un aumento en el número de GluRIIs y, con ello, de las PSDs (**Fig. R29 y 30**). Para analizar si la expresión crónica de PI3K es necesaria para aumentar el número de PSDs, cuantificamos el número de PSDs en animales *D42 – Gal4* y *D42 – Gal4 > UAS – PI3K*. Se utilizaron los mismos tiempos: 0h, 24h y 40h después de la activación de PI3K. En este experimento, se utilizaron los anticuerpos anti – GluRIIA y anti – HRP (**Fig. R39A – B**). Los resultados muestran que 24 horas después de activar PI3K, el número de PSDs aumenta de forma significativa en los animales que sobreexpresan PI3K ( $606 \pm 55$ ,  $n=10$ ) en comparación con los controles ( $458 \pm 38$ ,  $n=9$ ;  $p=0,0406$ ) (**Fig. R39C**). Esta diferencia en el número de PSDs se mantiene a las 40h de la expresión de PI3K: *D42 – Gal4 > UAS – PI3K* ( $817 \pm 61$ ,  $n=11$ ) y *D42 – Gal4* ( $637 \pm 35$ ,  $n=8$ ,  $p=0,0351$ ; **Fig. R39C**). Por otro lado, si se expresa PI3K<sup>DN</sup> se reduce el número de PSDs a las 40h en estos individuos *D42 – Gal4 > UAS – PI3K<sup>DN</sup>*, ( $444 \pm 29$ ,  $n=5$ ) frente a los *D42 – Gal4* ( $619 \pm 42$ ,  $n=5$ ,  $p=0,0045$ ; **Fig. R38D – F**). **En conclusión, la actividad de PI3K en el lado presináptico es necesaria y suficiente para la formación de nuevas PSDs en la NMJ.**

## 5. POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE PI3K.

### 5.1. EFECTOS DE PI3K EN LA TRANSCRIPCIÓN DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS.

El mecanismo ejecutor de la señalización proporcionada por la vía descrita en este estudio no es conocido aún. Para que se formen nuevas zonas activas y sus densidades postsinápticas es necesaria una gran síntesis proteica (revisado en Liu – Yesucevitz et al., 2011 y Jung et al., 2010). Por ello, quisimos averiguar, mediante QPCR, si el efecto sinaptogénico de PI3K se debía a un incremento en la transcripción de proteínas sinápticas.

Se analizaron las proteínas presinápticas Brp y Liprin (Fouquet et al, 2009), los receptores de glutamato postsinápticos (revisado en DiAntonio, 2006), una proteína de las vesículas sinápticas llamada Sinaptobrevina (Syb, revisado en Kidokoro, 2003) así como una molécula de señalización,



**Figura R39: La activación temporal de PI3K aumenta el número de PSDs.** Imágenes de las fibras 6/7 de **A)** *D42-Gal4* y **B)** *D42-Gal4> UAS-PI3K* teñidas contra GluRIIA (rojo) y  $\alpha$ -HRP (azul). Los recuadros en **A)** y **B)** son fotos ampliadas de ambas NMJ. **C)** Gráfica de los cambios en el número de sinapsis durante el tercer estadio larvario antes y después de activar PI3K en el día 1 de LIII. Se aprecian diferencias a las 24h y 40h después de la expresión de PI3K. Barra de escala: **A-B)**, 10  $\mu$ m; recuadros en **A-B)**, 3  $\mu$ m.

Wg, (Collins y DiAntonio, 2007). Se utilizaron larvas de tercer estadio ( $n > 3$ , mínimo 3 réplicas) a partir de las cuales se extrajo el ARN, se convirtió a ADNc mediante RT – PCR y finalmente, se hicieron QPCRs (Ver materiales y métodos para más detalles) utilizando sondas específicas para cada uno de los candidatos (Ver **Tabla II** en Materiales y Métodos). En la **Figura R40**, se muestran los datos de las QPCRs en controles (*elav – Gal4*), larvas que sobreexpresan PI3K (*elav – Gal4 > UAS – PI3K*) e individuos que expresan PI3K<sup>DN</sup> (*elav – Gal4 > UAS – PI3K<sup>DN</sup>*). No se observan diferencias significativas en las cantidades de ARNm de estas proteínas sinápticas respecto de su control excepto en el caso de Liprin (**Fig. R29A**). Por tanto, la transcripción no parece ser el mecanismo de acción por el cual PI3K da lugar a la formación de nuevas sinapsis.

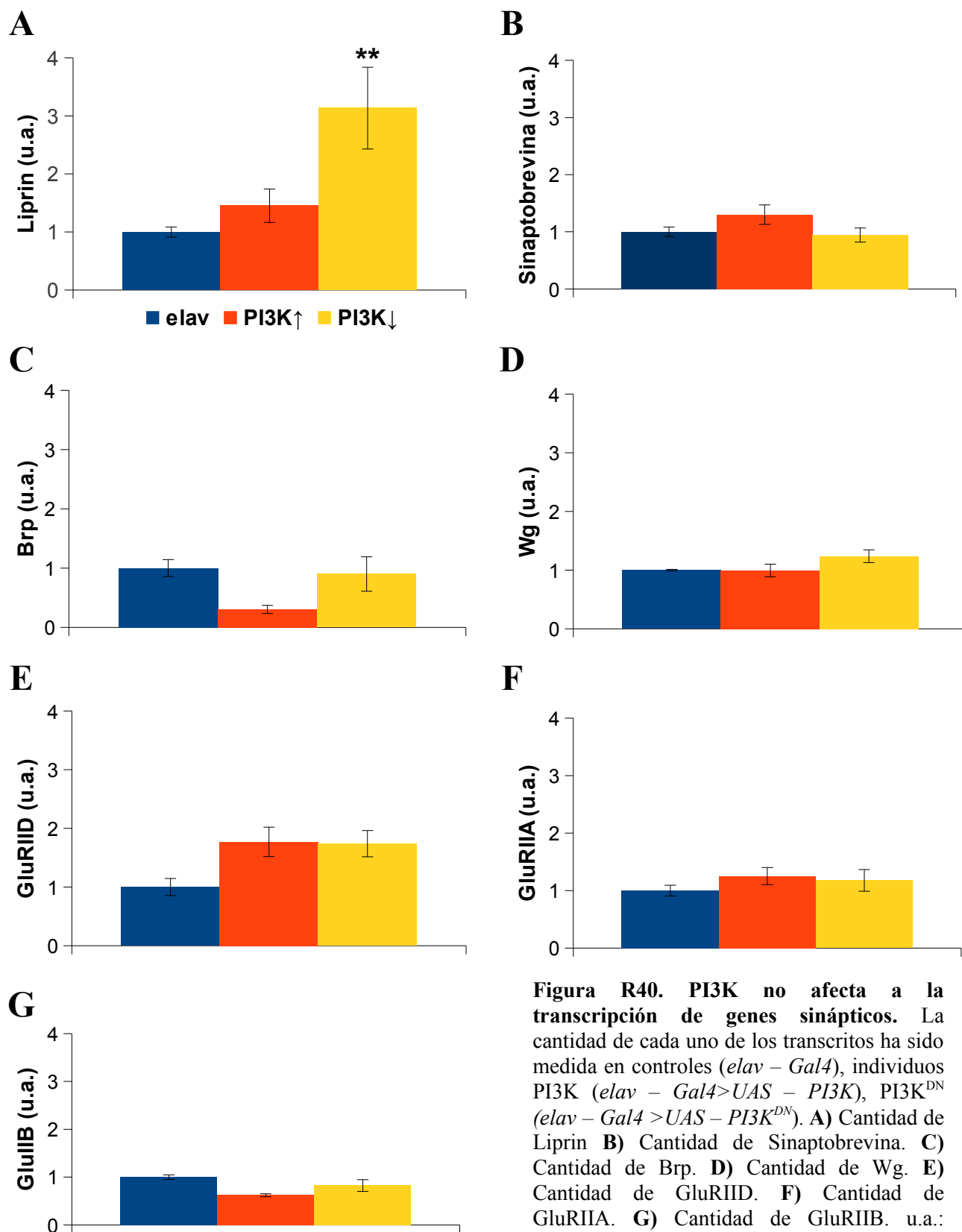
## 5.2. LA UBIQUITINACIÓN.

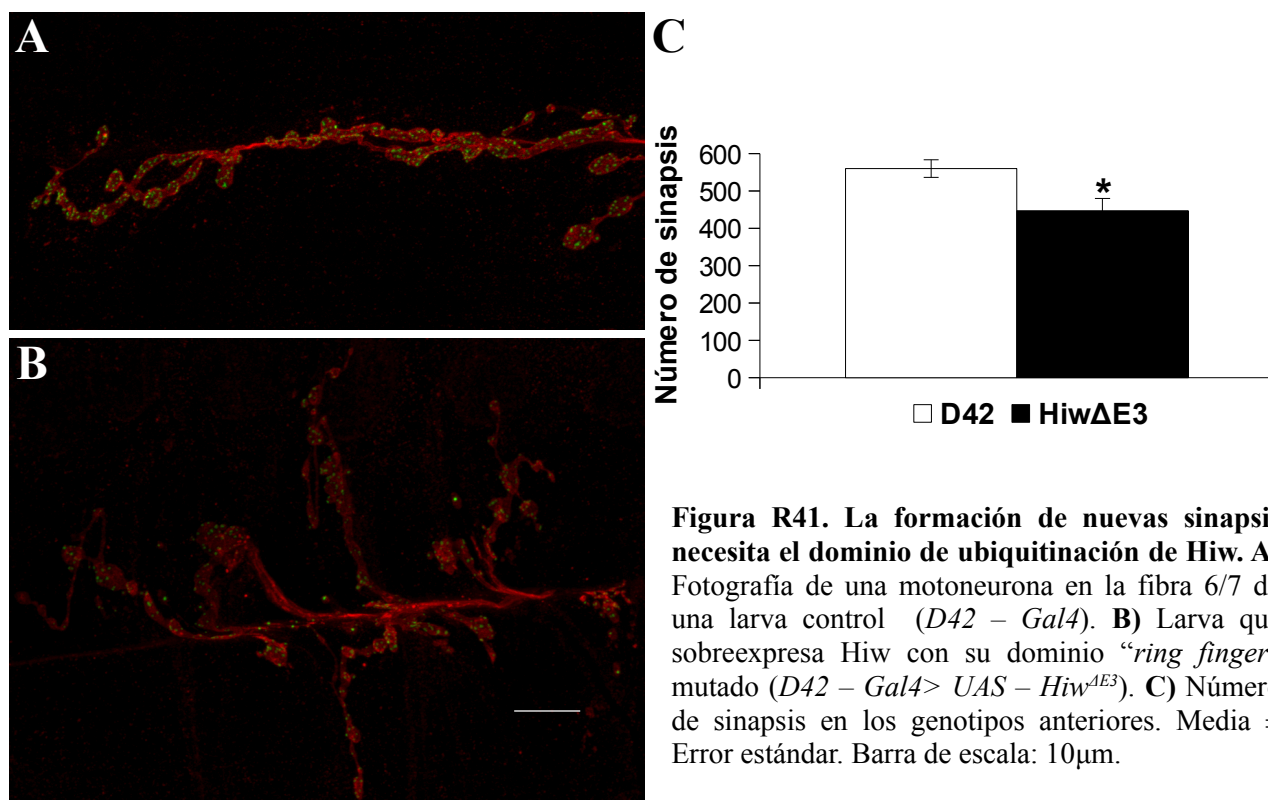
Como se ha demostrado en el apartado 2.3.2, la E3 ubiquitina ligasa Hiw forma parte de la ruta sinaptogénica dependiente de PI3K. Por ello, decidimos estudiar si el dominio de ubiquitinación de esta proteína (Wan et al., 2000) estaba relacionado directamente con la sinaptogénesis. Utilizamos una “construcción” de Hiw en la que su dominio “*RING finger*” había sido mutado mediante el cambio de dos cisteínas por serinas (*UAS – Hiw<sup>AE3</sup>*). Estas cisteínas son fundamentales para la unión al sustrato y su mutación impide la ubiquitinación de sustratos (Wu et al., 2005).

El número de sinapsis descendía en las larvas que tenían la ubiquitinación afectada (*D42 – Gal4 > UAS – Hiw<sup>AE3</sup>*;  $447 \pm 33$ ,  $n = 10$ ) respecto de sus controles (*D42 – Gal4*;  $560 \pm 24$ ,  $n = 10$ ;  $p = 0,0147$ ) (**Fig. R41**) con valores un poco más altos que los de los mutantes de Hiw (**Fig. R20C**). La morfología (**Fig. R41A**) es similar a la de los mutantes, con la NMJ más grande y con más ramificaciones (Collins et al., 2006; McCabe et al., 2004; Wan et al., 2000; Wu et al., 2005; **Fig. R20A**). Estos resultados indican que la ubiquitinación podría ser clave para la vía sinaptogénica dependiente de PI3K. Sin embargo, se necesitan más experimentos para demostrar y aclarar este posible mecanismo y validar los sustratos no ubiquitinados por Hiw que participan en la sinaptogénesis.

**En resumen, los datos indican (Fig. R40 – 41) que el mecanismo subyacente a la formación de sinapsis no afecta directamente a la transcripción, sino a la cantidad disponible**

de proteínas, probablemente, mediante ubiquitinación.







## **DISCUSIÓN**



# 1. ANÁLISIS DE LA VÍA SINAPTOGÉNICA DEPENDIENTE DE PI3K.

En esta Tesis Doctoral, hemos identificado elementos que, junto con PI3K, controlan la formación de nuevas sinapsis.

## 1.1. RELACIÓN DE PI3K, AKT Y GSK3 EN LA SINAPTOGÉNESIS.

Datos anteriores habían demostrado que PI3K, AKT y GSK3 tienen un papel en la sinaptogénesis (Martín – Peña et al., 2006; Cuesto et al., 2011). Aquí, hemos estudiado si estas tres quinasas forman parte de una misma ruta de formación de sinapsis mediante técnicas de biología molecular y análisis genético. Primero, cuantificando los niveles de AKT – P/AKT hemos demostrado que PI3K activa a AKT mediante fosforilación (**Fig. R1**), es decir, AKT es el efector sinaptogénico de PI3K. Por otro lado, hemos intentado averiguar si GSK3 también forma parte de la ruta o es parte de otra diferente en el contexto de la sinaptogénesis empleando un análisis de epistasia. El empleo de un ARNi frente a GSK3 (**Fig. R4**) da lugar a un aumento en la cantidad de sinapsis en concordancia con datos previos mostrando que la sobreexpresión de GSK3 produce un descenso en el número de sinapsis en ese mismo tipo neuronal (Martín – Peña et al., 2006). La coexpresión simultánea de PI3K y GSK3 (**Fig. R4**) muestra que sus efectos no son aditivos y, por tanto, podrían situarse en una misma vía. Sin embargo, no podemos indicar su orden jerárquico porque no predomina el efecto de ninguna de las dos quinasas. En la combinación de PI3K $\uparrow$  y GSK3 $\uparrow$ , predomina el efecto de GSK3 $\uparrow$ . Esto puede deberse a la diferencia en la cantidad de cada una de las proteínas. Así, al sobreexpresar GSK3 aumenta un 300% la cantidad de esta proteína (**Fig. R3**) mientras que hiperexpresar PI3K incrementa la cantidad de AKT – P en un 35% (**Fig. R1**). Al incrementarse tanto la cantidad de GSK3 es posible que AKT (activado) no pueda inhibir todo GSK3 dando lugar, finalmente, a una bajada en el número de sinapsis (**Fig. R4**). Por otro lado, en la condición PI3K $\downarrow$  y GSK3 $\downarrow$ , predomina el efecto de PI3K $\downarrow$ . De nuevo, una posible explicación sería la variación de los niveles de proteína. Es decir, el ARNi frente a GSK3 disminuye la proteína un 50% (**Fig. R3**) mientras que, por su parte, PI3K<sup>DN</sup> baja la cantidad de AKT – P un 22% (**Fig. R1**). Al tener menos cantidad de AKT activo disponible para fosforilar e inhibir GSK3, la cantidad de GSK3 activo restante podría ser suficiente para generar una bajada de la sinaptogénesis. Otra posible explicación estaría basada en la utilización de la herramienta genética empleada para reducir los niveles de proteínas. Es decir, el uso de un dominante negativo frente a un ARNi. Mientras que

el primero interfiere con la función de la proteína, el segundo impide la transcripción. Lo ideal para descartar este efecto hubiera sido utilizar en ambos casos o bien un dominante negativo o bien un ARNi. Sin embargo, en el caso de GSK3, su dominante negativo tiene efecto en el número de sinapsis (**Fig. R2**) por lo que debe emplearse un ARNi para disminuir la cantidad de proteína. Por el contrario, en el caso de PI3K, su dominante negativo tiene efecto en el número de sinapsis (**Fig. R3**) y su ARNi no estaba disponible en el momento de realizar los experimentos. Por último, otra posibilidad es que alguna de las construcciones se exprese más que otra debido a su lugar de inserción (revisado en Bischof y Basler, 2008). En nuestra opinión, la variación en los niveles de proteína es la explicación más plausible.

Para esclarecer el orden jerárquico realizamos un análisis de epistasia entre GSK3 y AKT. Si sobreexpresamos AKT a la vez que GSK3<sup>ARNi</sup> sus efectos no se suman (**Fig. R5**). Este hecho concuerda con los experimentos anteriores (**Fig. R1 – 4**) que apuntan a que las tres quinasas pertenecen a una misma vía sinaptogénica. Si analizamos el número de sinapsis en mutantes heterocigotos de AKT el número de sinapsis no se ve reducido (**Fig. R5**). Sin embargo, si en esos mutantes reducimos la expresión de GSK3, se anula el efecto de dicha expresión. Es decir, no tenemos una subida en el número de sinapsis como era previsible. Por tanto, aunque los mutantes heterocigotos por sí solos no reducen las sinapsis, sí tienen un efecto sinaptogénico ya que anulan a GSK3. Probablemente, esto es debido a que al reducir la cantidad AKT el remanente no es suficiente para inactivar completamente GSK3 siendo el balance final en el número de sinapsis un poco superior al control (**Fig. R5**) e indicando que GSK3 podría estar por debajo de AKT. Del mismo modo, cuando sobreexpresamos GSK3 en esos mutantes tampoco se ven reducidas las sinapsis (**Fig. R5**). Esto puede deberse a que solamente 5 larvas de una progenie de aprox. 200 con este genotipo (*D42 – Gal4>UAS – GSK3; AKT<sup>-/+</sup>*) sobrevivieron hasta larva de tercer estadio y quizás no expresaban en tanta cantidad GSK3, dando lugar a un número de sinapsis similar al control. Por último, analizamos la cantidad de AKT – P al sobreexpresar o hipoexpresar GSK3 sin observar cambios (**Fig. R6**). Esto indica que GSK3 podría estar por debajo de AKT ya que no afecta a sus niveles de fosforilación. **En conjunto, nuestros resultados nos permiten concluir que las tres proteínas forman parte de una misma vía sinaptogénica siendo su orden jerárquico PI3K > AKT > GSK3 (Fig. D1) al igual que sucede en otras vías de señalización.**

## 1. 2. EL RECEPTOR (WIT) Y EL LIGANDO (GBB).

Wit es homólogo de los receptores BMPRII en mamíferos y se expresa en el SNC. En *Drosophila* se ha demostrado su papel en el crecimiento sináptico de la NMJ (Marqués et al, 2002; Aberle et al., 2002, revisado en Marqués, 2005). Además, se ha identificado a Gbb como su ligando (McCabe et al, 2003; Marqués et al, 2003; revisado en Keshishian y Kim, 2004). Nosotros hemos estudiado la función de ambas proteínas en la sinaptogénesis dependiente de PI3K.

Hemos observado que la hiperexpresión de Wit (**Fig. R7**) aumenta significativamente el número de sinapsis. Además, si se expresa conjuntamente con PI3K<sup>DN</sup>, los efectos de la sobreexpresión de Wit se anulan (**Fig. R7**). Para completar el estudio, analizamos la pérdida de función de Wit mediante mutantes transheterocigóticos (**Fig. R8**) observando una disminución de sinapsis. Por tanto, queda demostrado el papel de Wit en la sinaptogénesis. Asimismo, si sobreexpresamos PI3K en ese fondo mutante no rescatamos el fenotipo de Wit, indicando que PI3K necesita ser activado por Wit. Así es el caso en mamíferos donde se ha demostrado que PI3K es activado por los receptores de tipo BMPRII en células cardíacas de ratón (Sui et al., 2009) y en procesos de quimiotaxis en cultivos celulares de ratón y humanos (Perron y Dodd, 2009). Por lo tanto, esta tesis presenta las primeras evidencias experimentales de que Wit activa a PI3K en *Drosophila*.

El papel de Gbb en la sinaptogénesis también ha sido demostrado en esta Tesis. La sobreexpresión de Gbb en el músculo, donde es requerido normalmente (McCabe et al., 2003), da lugar a un incremento en el número de sinapsis (**Fig. R9**). Por otro lado, los mutantes de falta de función de Gbb muestran menos sinapsis (**Fig. R10**). Además, el fenotipo causado por la hipoexpresión de Wit es rescatado por la sobreexpresión de PI3K (**Fig. R10**). **En suma, nuestros resultados demuestran que Wit, Gbb y PI3K forman parte de una misma ruta sinaptogénica siendo Gbb el ligando, Wit el receptor y colocándose PI3K por debajo de ambos (Fig. D1).**

## 1.3. LOS RECEPTORES POSTSINÁPTICOS (HTL Y BTL).

Como se ha descrito, Htl y Btl son los homólogos de los receptores FGFR en mamíferos (ver Resultados). Debido a que son receptores tirosina quinasa capaces de activar a PI3K (revisado en

Mason, 2007) y que se han relacionado a sus ligandos FGF con la formación de sinapsis (Li et al, 2002) y el anclaje de vesículas (revisado en Mason, 2007) decidimos estudiar su papel en la sinaptogénesis. Sus mutantes de pérdida de función (**Fig. R11**) aumentan el número de sinapsis, por lo que deducimos que estos receptores podrían tener un papel antisinaptogénico. No observamos efectos expresando presinápticamente ni un ARNi frente a Htl ni sobreexpresando Btl de forma constitutiva. Este dato no es debido a que las construcciones no funcionen sino a que estos receptores se localizan postsinápticamente (músculo), como se observa en la **Fig. R12**, y en concordancia con datos publicados recientemente que han demostrado su localización postsináptica (Sen et al., 2011). **Por tanto, cabe concluir que Htl y Btl regulan negativamente la sinaptogénesis de la NMJ desde el músculo.**

Más arriba habíamos demostrado el papel de Gbb en la sinaptogénesis (**Fig. R7 – 10**). Puesto que Gbb es secretado desde el músculo, estudiamos si los receptores postsinápticos Htl y Btl regulan transcripcionalmente a este ligando. Los resultados de las QPCR (**Fig. R13**) indican que Htl y Btl regulan de formas opuestas a Gbb. En los mutantes de Htl aumenta la transcripción de *gbb* y en los de Btl disminuye. Puesto que ambos receptores son antisinaptogénicos deben existir mecanismos que regulen la cantidad o la secreción de Gbb y de esta forma la sinaptogénesis desde el músculo.

Por otro lado, puesto que la comunicación entre la neurona y el músculo para formar las sinapsis es posiblemente bidireccional, estudiamos si PI3K regulaba la transcripción de los ligandos conocidos de Htl (Pyr y Ths) y Btl (Bnl). Nuestros datos no indican diferencias en la transcripción de ninguno de ellos (**Fig. R14**). Esto puede deberse a que estos ligandos no se expresen en la motoneurona y queda abierta la posibilidad de que se expresen por ejemplo en la glía (Franzdóttir et al., 2009). Otra posibilidad es que en esta función sinaptogénica de los receptores FGFR sean otros los ligandos que se secreten desde la NMJ y sean controlados por PI3K o que estos receptores Htl y Btl sean regulados de forma trans – sináptica. De hecho, ha sido demostrado que las moléculas de adhesión celular homofilica Fasciclina II (homólogo de NCAM; Schuster et al., 1996a y b) y Neuroglian (homólogo de L1 en mamíferos; Grenningloh et al., 1990) necesitan a Htl para el crecimiento *in vitro* de neuritas (Forni et al., 2004).

#### 1.4. PROTEÍNAS POR DEBAJO DE PI3K EN LA VÍA SINAPTOGÉNICA.

Hemos demostrado que Ras y las MAPK tienen un papel en la formación de sinapsis. Así, la sobreexpresión de Ras da lugar a un aumento en la cantidad de sinapsis y, si se coexpresan a la vez que PI3K, sus efectos no se suman (**Fig. R16**). Este dato indica que podrían pertenecer a una misma vía sinaptogénica. Por otra parte, si se expresa un dominante negativo frente a Ras (Ras<sup>DN</sup>) no afecta el número de sinapsis. Sin embargo, si Ras<sup>DN</sup> es expresado a la vez que PI3K, anula el efecto de subida de sinapsis de ésta última probando que existe una interacción entre ambas (**Fig. R17**). Esta supresión del fenotipo podría deberse a dos razones: 1) que PI3K necesita ser activada por Ras (Revisado en Vanhaesebroeck et al., 2001) o 2) que Ras se sitúa por debajo de PI3K. Con el fin de aclarar el orden jerárquico de estas quinasas, utilizamos una versión de PI3K con el dominio RBD mutado (PI3K\*; ver Resultados) de forma que no puede ser activada por Ras. Si se compara la sobreexpresión de PI3K con PI3K\* el número de sinapsis es el mismo (**Fig. R18**), es decir, PI3K no necesita ser activada por Ras para ejercer su función sinaptogénica. Puesto que Ras tiene un efecto en la sinaptogénesis y suprime el fenotipo de PI3K, debe situarse por debajo de ella. La activación de Ras por PI3K ha sido descrita previamente en la literatura (ver Introducción). **Por tanto, nuestros datos indican que Ras tiene un papel en la sinaptogénesis y que se sitúa por debajo de PI3K (Fig. D1).**

Hiw es una E3 ubiquitina ligasa que regula negativamente el crecimiento de la NMJ en *Drosophila* (Collins et al., 2006; McCabe et al., 2004; ver Resultados). Hemos comprobado en este trabajo que no sólo regula el crecimiento sináptico sino también la sinaptogénesis. Si Hiw se sobreexpresa, el número de sinapsis aumenta significativamente (**Fig. R19**). Si combinamos esta sobreexpresión con la hiperexpresión de PI3K sus efectos no se suman, indicando que pueden formar parte de la misma ruta. Además, si se expresa Hiw<sup>↑</sup> con PI3K<sup>↓</sup> se anula el aumento en la cantidad de sinapsis debida a Hiw (**Fig. R19**) demostrando que ambas proteínas interaccionan funcionalmente. Por otra parte, los mutantes hemicigóticos de Hiw reducen el número de sinapsis a la vez que aumentan el tamaño de la NMJ (**Fig. R20**). Este fenotipo de sobrecrecimiento había sido descrito anteriormente (Collins et al., 2006; McCabe et al., 2004; Wan et al., 2000; Wu et al., 2005) y se debe a la inhibición de la vía de JNK y de Medea. Con este experimento, probamos que el crecimiento celular y la sinaptogénesis no tienen una relación de causa – efecto e incluso pueden ir en direcciones opuestas, un resultado en consonancia con datos obtenidos previamente (Martín –

Peña et al., 2006). Asimismo, si en el fenotipo de falta de función de Hiw se sobreexpresa PI3K, el número de sinapsis es similar al de los mutantes de Hiw solos. Es posible que Hiw tenga algún dominio para ser fosforilado directamente por PI3K o por su efector AKT. De esta forma, cuando utilizamos PI3K<sup>DN</sup> Hiw no se activa y no aumenta el número de sinapsis (**Fig. R19**) y, por otro lado, cuando Hiw está mutado PI3K no puede activarlo. Por otra parte, se ha descrito que Hiw puede regular negativamente al complejo TSC1 – TSC2 en el ojo (Murthy et al., 2004). Como se ha mencionado (ver Introducción), la falta de función TSC2 tiene un papel sinaptogénico (Canal et al., 1994; Canal et al., 1998; Acebes y Ferrús, 2001). De esta forma, Hiw podría regular la sinaptogénesis también inhibiendo TSC2. **Nuestros experimentos confirman la interacción entre Hiw y PI3K situándose Hiw por debajo de PI3K en la vía sinaptogénica (Fig. D1).**

Puesto que tanto Ras como Hiw son conocidas por regular MAPK (revisado en Goberdhan y Wilson, 1998; Collins et al., 2006), y que la vía de JNK en mamíferos regula el crecimiento sináptico (Collins et al., 2006) hemos estudiado su papel en la formación de sinapsis. Así, si se sobreexpresa Wnd, la primera de las MAPK (ver Resultados), aumenta significativamente el número de sinapsis (**Fig. R21**). Si se sobreexpresa Hep, la segunda MAPK, también aumenta la cantidad de sinapsis ligeramente pero sin llegar a ser significativo (**Fig. R21**). Por último, la sobreexpresión de Bsk también aumenta de forma significativa el número de sinapsis y si se sobreexpresa a la vez PI3K sus efectos no son aditivos (**Fig. R22**). Este último dato indicaría que pueden formar parte de una misma vía. Para completar este estudio, se deberán utilizar formas de falta de función de las tres MAPK u otras herramientas que permitan hipoexpresarlas. **Con los datos disponibles, podemos concluir que, muy probablemente, la vía de JNK en Drosophila está implicada en la sinaptogénesis (Fig. D1).**

A continuación, probamos la interacción de Ras con la vía de JNK en la sinaptogénesis. Si se sobreexpresa Ras<sup>DN</sup> junto con Bsk se suprime el efecto sinaptogénico de Bsk (**Fig. R23**). Esto indica que ambas proteínas interaccionan para formar sinapsis y dado que Ras activa la vía de JNK en otros contextos metabólicos (Minden et al, 1994b; Igaki et al., 2006; Brumby et al., 2011) pensamos que en este caso también necesita dicha activación. **Estos resultados refuerzan la conclusión anterior de que la vía de JNK está implicada en la sinaptogénesis y, además, que necesita la activación de Ras para ejercer esta función (Fig. D1).**



## 1.5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

### 1.5.1. Jun y Fos.

Jun y Fos son dos factores de transcripción que junto con la vía de JNK han sido implicados en la plasticidad sináptica (Sanyal et al., 2002; ver Resultados). Ya que para formar nuevas sinapsis se necesitan gran cantidad de proteínas estructurales en la zona activa presináptica y la densidad postsináptica, es muy probable que exista algún factor de transcripción implicado en la sinaptogénesis. De esta forma, hemos analizado la hiper- e hipoexpresión de ambos candidatos, Jun y Fos, y hemos estudiado su papel en la formación de sinapsis. Si sobreexpresamos Jun aumenta la cantidad de sinapsis pero no ocurre lo mismo si se sobreexpresa Fos (**Fig. R24**). Si se expresan al alza ambos, el número de sinapsis no es diferente con respecto al de Jun solo (**Fig. R24**). Jun parece intervenir en la formación de sinapsis. Por el contrario, si analizamos el fenotipo de Jun<sup>DN</sup> no se modifica la cantidad de las sinapsis mientras que con Fos<sup>DN</sup> sí. Sobreexpresados ambos dominantes negativos la cantidad de sinapsis es igual a la de Fos<sup>DN</sup> (**Fig. R25**). Fos también parece tener un papel en sinaptogénesis. Además, si sobreexpresamos Jun a la vez que Fos<sup>DN</sup>, predomina el efecto de este último disminuyendo las sinapsis (**Fig. R26**) e indicando que hay una interacción entre ellos. Por tanto, ambos factores de transcripción juegan un papel en la sinaptogénesis. Pensamos que ambos factores podrían formar heterodímeros como se ha demostrado en otras funciones metabólicas (Ciapponi y Bohmann, 2002) y por eso Fos puede anular el efecto de Jun. Esta formación de heterodímeros podría dar especificidad en la disyuntiva: sinaptogénesis vs crecimiento de la NMJ, ya que en el crecimiento de la NMJ sólo parece estar implicado Fos (Collins et al., 2006). **Podemos concluir que Fos y Jun, probablemente formando heterodímeros, contribuyen a ejecutar la formación de sinapsis (Fig. D1).**

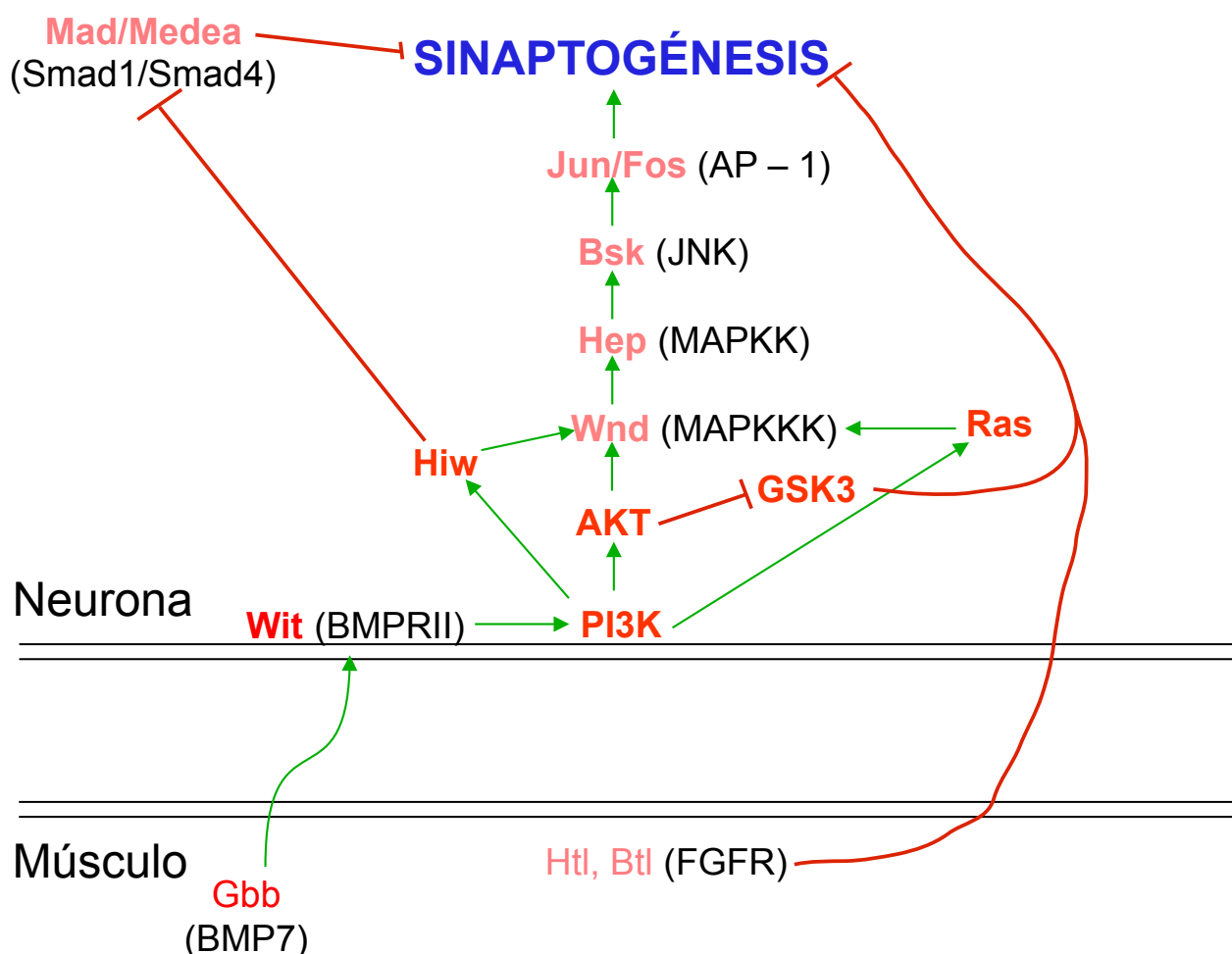
### 1.5.2. Mad y Medea.

Dado que Medea es inhibida por Hiw (McCabe et al., 2004) y que Mad puede ser fosforilado por Wit en el SNC (Marqués et al., 2002), estudiamos el efecto de este factor de transcripción y su cofactor en la sinaptogénesis. La sobreexpresión de Medea produce un descenso en el número de sinapsis (**Fig. R27**) mientras que su hipoexpresión mediante el uso de Medea<sup>ARNi</sup> da lugar a un aumento significativo en la cantidad de sinapsis (**Fig. R27**). Es decir, Medea, al contrario

que Jun y Fos, sería un factor de transcripción antisinaptogénico. Por su parte, la expresión de un ARNi frente a Mad da lugar a una disminución de la totalidad de las sinapsis, es decir, también es antisinaptogénica. **Concluimos, por tanto, que Medea y Mad también están implicadas en la formación de sinapsis (Fig. D1).**

## 1.6. CANDIDATOS NO SINAPTOGÉNICOS.

Los receptores de tipo tirosina quinasa eran buenos candidatos para ser receptores de la vía puesto que pueden activar a PI3K (ver Introducción). Martín – Peña et al., 2006 demostraron que el ni el InR ni el EGFR eran sinaptogénicos. Además, otras proteínas de la vía canónica de la insulina como PTEN, FoxO, TOR o S6K tampoco tienen efectos en la formación de sinapsis (Martín – Peña, 2007). Por otra parte, hemos demostrado que los receptores homólogos de los Trk en *Drosophila* (Otk y NrK) tampoco tienen un papel en la sinaptogénesis (**Fig. R15**). La expresión de un receptor exógeno a la NMJ (Torso) tampoco puede dar lugar a la sinaptogénesis (ver Resultados). **Por lo tanto, podemos concluir que es necesaria una señalización específica para que se produzca sinaptogénesis.**



**Figura D1. Esquema simplificado de la vía sinaptogénica dependiente de PI3K.** En el dibujo, se muestran todas las proteínas que se han descrito en la tesis y tienen un papel en la sinaptogénesis así como su orden jerárquico. Las dos raya negras indican la membrana donde empezaría la señalización de la vía. El color rojo indica que tanto la hiperexpresión como la hipopresión afectan el número de sinapsis. El color rosa indica que solo una de ellas lo afecta o que no se han ensayado ambos. Flecha verde = Activación. Flecha roja= Inhibición.

## 2. EFECTO DE PI3K EN LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO Y OTRAS PROTEÍNAS POSTSINÁPTICAS.

PI3K regula el número de sinapsis así como su funcionalidad y mantenimiento (Martín – Peña et al., 2006; Cuesto et al., 2011; esta Tesis). Nos interesaba conocer si el efecto de PI3K es presináptico, postsináptico o ambos a la vez. Además, queríamos saber si afecta a proteínas del lado postsináptico como los receptores de glutamato o Dlg. Para ello, estudiamos si la sobreexpresión presináptica de PI3K afecta al número de densidades postsinápticas (PSDs) donde se localizan los receptores de glutamato (ver Introducción y Resultados). Hemos probado que dicha sobreexpresión aumenta las PSDs entre un 32 – 43% (en función del marcador utilizado; **Fig. R29 y Tabla R3**).

Además, si utilizamos PI3K<sup>DN</sup> el número de PSDs disminuye (**Fig. R30**). **Por tanto, PI3K controla el número de PSDs en la NMJ de *Drosophila*** (Jordán – Álvarez et al., 2012).

Por otro lado, analizamos mediante inmunoblot si PI3K cambiaba la cantidad de los GluRIIA y de Dlg al ser hiper- o hipoexpresada. Cuando se sobreexpresa PI3K los niveles de GluRII aumenta un 42% en la NMJ y un 24% en SNC larvario (**Fig. R31 – 32**). Por su parte, los niveles de las isoformas DlgA y DlgS97 aumenta 83 y 72%, respectivamente en la NMJ, y alrededor de un 15% en el SNC (**Fig. R33 – 34**). El PI3K<sup>DN</sup> no disminuyó la cantidad de GluRIIA ni tampoco de las isoformas de Dlg (**Fig. R31 – 34**). Pensamos que este resultado negativo puede deberse a que atenuar la actividad de PI3K mediante este dominante negativo no es suficiente para disminuir de forma eficaz los niveles de las proteínas postsinápticas. **En todo caso, concluimos que la sobreexpresión presináptica de PI3K regula los niveles de GluRIIA, DlgA y DlgS97 en la región postsináptica** (Jordán – Álvarez et al., 2012).

Mediante la técnica de FRAP (ver Introducción y Materiales y Métodos) estudiamos si PI3K influía en la dinámica de formación de los receptores de glutamato. La incorporación de la subunidad GluRIIA está relacionada directamente con el crecimiento de las PSDs. Además, a medida que maduran las PSDs se produce un balance entre las subunidades GluRIIA y GluRIIB (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). No hemos encontrado diferencias significativas en la dinámica de formación de los GluRII ni en la velocidad de formación de las PSDs (aunque su número era mayor en los individuos PI3K) (**Fig. R35**). **Por tanto, PI3K promueve la formación de sinapsis sin alterar la tasa de incorporación de sus componentes estructurales** (Jordán – Álvarez et al., 2012).

Decidimos también estudiar si la sobreexpresión postsináptica de PI3K también alteraba el número de sinapsis o PSDs al igual que desde el lado presináptico. No encontramos diferencias ni en la cantidad de sinapsis ni en las PSDs (**Fig. R36**). Este efecto únicamente presináptico de PI3K, en *Drosophila*, difiere del de mamíferos donde se ha demostrado que PI3K postsináptica controla el recambio de los receptores de tipo AMPA (Arendt et al., 2010). Tampoco se aprecian diferencias en el número de botones de la NMJ (**Tabla R6**), al contrario de lo que ocurre cuando PI3K es expresada presinápticamente donde aumenta el número de botones por NMJ (**Tabla R5**) (Martín – Peña et al., 2006). **Podemos concluir que los efectos de PI3K en la sinaptogénesis de *Drosophila* son solo presinápticos** (Jordán – Álvarez et al., 2012). Sin embargo, desconocemos el mecanismo

por el cuál PI3K regula las proteínas postsinápticas desde el lado presináptica. Una opción sería un aumento en la síntesis de los receptores (ver siguiente apartado) o una reducción en la degradación proteica. Ambos procesos son importantes en la regulación del desarrollo y función de la NMJ de *Drosophila* (van Roessel et al., 2004; Zalfa et al., 2006). Otra posibilidad es que afecte al tráfico celular ya que se sabe que los receptores de glutamato se incorporan a la membrana desde acúmulos difusos por todo el músculo (Rasse et al., 2005). Tanto el tráfico celular como la posibilidad de un aumento en la síntesis o una disminución en la degradación podrían estar regulados por mecanismos trans – sinápticos, concretamente por Neurolignina – Neuronexina; que han demostrado ser importantes para el ensamblaje de zona presináptica con la región postsináptica (Owald et al., 2012). Además, se ha comprobado que PI3K regula los niveles de Neurolignina en la NMJ de *Drosophila* (Mozer y Sandstrom, 2012).

### 3. POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE PI3K.

#### 3.1. LA TRANSCRIPCIÓN.

La formación de nuevas zonas activas donde se libere el neurotransmisor así como densidades postsinápticas donde éste se unirá a su receptor específico requiere la síntesis de nuevas proteínas (Revisado en Liu – Yesucevitz et al., 2011 y Jung et al., 2010). Dado que PI3K dispara la formación tanto de AZ como de PSD la transcripción es un posible mecanismo candidato para regular ambos procesos. Hemos analizado la transcripción de diferentes genes relacionados con las sinapsis como Brp o GluRII (**Fig. R40**). Sin embargo, PI3K no afecta a la transcripción de ninguno de ellos. **Por lo tanto, la formación de sinapsis dependiente de PI3K no parece estar regulada por la transcripción de, al menos, estos genes sinápticos.**

#### 3.2. LA UBIQUITINACIÓN.

Hemos demostrado que la E3 ubiquitina ligasa Hiw está implicada en la sinaptogénesis y que forma parte de la misma vía que PI3K (ver Resultados). Puesto que Hiw tiene una función en la ubiquitinación decidimos comprobar si este proceso era necesario para formar nuevas sinapsis. Si se sobreexpresa una versión de Hiw que tiene mutado su dominio de ubiquitinación el número de

sinapsis no sólo no aumenta sino que descende de manera drástica (**Fig. R41**) alcanzando niveles similares a los de los mutantes de falta de función de Hiw (**Fig. R20**). Probablemente, el tipo de ubiquitinación es importante ya que Hiw parece inhibir por un lado el crecimiento sináptico (Collins et al., 2006; McCabe et al., 2004) y por otro está favoreciendo la sinaptogénesis (esta Tesis). Se sabe que la monoubiquitinación suele promover la estabilización de proteínas mientras que las poliubiquitinaciones señalizan para su degradación en el proteasoma (Finley et al., 2004; Hicke y Dunn, 2003). Además, existe una proteína llamada Fat facets (Faf) que es una enzima de deubiquitinación (Huang et al., 1995) y tiene funciones opuestas a Hiw en la NMJ. Su sobreexpresión da lugar a un aumento en el número de botones y ramificaciones y disminuye la frecuencia de liberación espontánea (DiAntonio et al., 2001). Por otro lado, existe otra E3 ubiquitina ligasa llamada Bendless que también parece regular el tamaño de NMJ pero de manera opuesta a Hiw. Sus mutantes dan lugar a NMJ de menor tamaño y parece ser independiente tanto de la vía de JNK como de la de BMP (Uthaman et al., 2008). Por lo tanto, creemos que la ubiquitinación podría ser un mecanismo regulador de la sinaptogénesis al igual que lo es del crecimiento sináptico (Revisado en DiAntonio y Hicke, 2004; Hegde y DiAntonio, 2002). Podemos concluir que la ubiquitinación tiene un papel relevante en la sinaptogénesis dependiente de PI3K.

**A la vista de nuestros datos (Fig. R40 – 41) podemos concluir que el mecanismo por el cual PI3K forma sinapsis no regula directamente la transcripción, pero sí a la cantidad de proteínas a través de, probablemente, la ubiquitinación dependiente de Hiw.**

#### **4. CONTROL TEMPORAL DE LAS SINAPSIS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.**

En todos los experimentos mencionados anteriormente, la expresión de PI3K se había mantenido de forma crónica durante todo el desarrollo. Para averiguar si la sinaptogénesis era un efecto secundario del desarrollo decidimos sobreexpresar PI3K de forma aguda sólo en larvas de tercer estadio. Nuestros datos prueban que PI3K es necesaria y suficiente para inducir sinapsis en un tiempo de entre 20 – 30 horas (**Fig. R37**) en concordancia con datos previos (Rasse et al., 2005; Martín – Peña et al., 2006). Sin embargo, la expresión aguda de PI3K da lugar a un aumento menor en el número de sinapsis que cuando se expresa de forma crónica (**Fig. R4** vs **Fig. R37**) esto puede deberse a que no ha habido tiempo suficiente para que las proteínas estructurales de la sinapsis se

desplacen y acumulen en la membrana de la NMJ. En mamíferos, de forma similar, el tratamiento crónico con un péptido activador de PI3K induce la formación de un número mayor de espinas en neuronas de hipocampo que si se efectúa un tratamiento agudo (Cuesto et al., 2011). Por otra parte, si se expresa PI3K<sup>DN</sup> en las mismas condiciones las sinapsis se ven reducidas (**Fig. R38**). Además, si se realiza el mismo experimento analizando el efecto en el número de PSDs, éstas aumentan o disminuyen al cabo de 24 horas (**Fig. R38 – 39**). Por lo tanto, PI3K es necesaria y suficiente para inducir sinapsis y PSDs en la NMJ (Jordán – Álvarez et al., 2012).

Por otra parte, sabemos que estas sinapsis son funcionales y que provocan cambios comportamentales en *Drosophila* y mamíferos (Martín – Peña et al., 2006; Acebes et al., 2011; Cuesto et al., 2011). Puesto que ahora conocemos gran parte de la vía de señalización (esta Tesis) y que se sabe que existen situaciones patológicas en las que se pierden sinapsis de forma temprana como el Alzheimer o el Parkinson (Scheff y Price, 2006), estos nuevos elementos identificados podrían ser nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de dichas enfermedades. **Por lo tanto, pensamos que la descripción de esta vía sinaptogénica junto con que la sinaptogénesis sea inducible, puede ser el fundamento de terapias futuras aplicables en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.**





## **CONCLUSIONES**



1. PI3K da lugar a la formación de nuevas sinapsis desde el lado presináptico mediante la activación de AKT. Por debajo de ambas se situaría GSK3 con un papel antisinaptogénico.
2. Wit, Gbb y PI3K pertenecen a una misma vía sinaptogénica donde Gbb es el ligando que activa al receptor presináptico Wit. A su vez, Wit activa a PI3K dando lugar a una señalización intracelular específica que acabará determinado el número de sinapsis.
3. Htl y Btl son dos receptores postsinápticos antisinaptogénicos que modulan la sinaptogénesis a través de la regulación de la transcripción de Gbb.
4. Ras induce sinaptogénesis situándose funcionalmente por debajo de PI3K. Además, las quinasas de la vía de JNK: Wnd, Hep y Bsk también están implicadas en esta señalización sinaptogénica.
5. Hiw regula la formación de sinapsis y necesita la activación directa de PI3K o de su efector AKT.
6. Los factores de transcripción Jun y Fos actúan de manera conjunta favoreciendo la formación de nuevas sinapsis. Por el contrario, Mad y Medea cooperan inhibiendo la sinaptogénesis.
7. PI3K controla desde el lado presináptico el número de PSDs de la NMJ sin alterar la dinámica de formación de los receptores de glutamato. La expresión postsináptica de PI3K no varía el número de sinapsis ni el de PSD, es decir, el efecto sinaptogénico de PI3K es exclusivamente presináptico.
8. El mecanismo por el cuál la vía sinaptogénica forma sinapsis no afecta a la transcripción pero si a la cantidad disponible de proteínas, probablemente, mediante ubiquitinación.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Aberle, H., Haghighi, A. P., Fetter, R. D., McCabe, B. D., Magalhaes, T. R. and Goodman, C. S.** (2002). wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **33**, 545-58.
- Acebes, A. and Ferrus, A.** (2001). Increasing the number of synapses modifies olfactory perception in *Drosophila*. *J Neurosci* **21**, 6264-73.
- Acebes, A., Martin-Pena, A., Chevalier, V. and Ferrus, A.** (2011). Synapse loss in olfactory local interneurons modifies perception. *J Neurosci* **31**, 2734-45.
- Acebes, A. and Morales, M.** (2012). At a PI3K crossroads: lessons from flies and rodents. *Rev Neurosci* **23**, 29-37.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B. A.** (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* **15**, 6541-51.
- Arendt, K. L., Royo, M., Fernandez-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C. N., Martens, J. R. and Esteban, J. A.** (2010). PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* **13**, 36-44.
- Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T. and Miyazono, K.** (2000). BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* **221**, 249-58.
- Bevilaqua, L. R., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I. and Cammarota, M.** (2003). Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* **17**, 897-902.
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J., Wynshaw-Boris, A. and Nussbaum, R. L.** (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**, 10963-8.
- Bijur, G. N. and Jope, R. S.** (2001). Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* **276**, 37436-42.
- Bijur, G. N. and Jope, R. S.** (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* **14**, 2415-9.
- Bilen, J. and Bonini, N. M.** (2005). *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* **39**, 153-71.
- Bourouis, M.** (2002). Targeted increase in shaggy activity levels blocks wingless signaling. *Genesis* **34**, 99-102.

- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brumby, A. M., Goulding, K. R., Schlosser, T., Loi, S., Galea, R., Khoo, P., Bolden, J. E., Aigaki, T., Humbert, P. O. and Richardson, H. E.** (2011). Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*: a RhoGEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis. *Genetics* **188**, 105-25.
- Cafferty, P., Yu, L. and Rao, Y.** (2004). The receptor tyrosine kinase Off-track is required for layer-specific neuronal connectivity in *Drosophila*. *Development* **131**, 5287-95.
- Canal, I., Farinas, C. I., Gho, M. and Ferrus, A.** (1994). The presynaptic cell determines the number of synapses in the *Drosophila* optic ganglia. *Eur J Neurosci* **6**, 1423-31.
- Cantley, L. C.** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-7.
- Carracedo, A. and Pandolfi, P. P.** (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**, 5527-41.
- Ciapponi, L. and Bohmann, D.** (2002). An essential function of AP-1 heterodimers in *Drosophila* development. *Mech Dev* **115**, 35-40.
- Coffer, P. J., Jin, J. and Woodgett, J. R.** (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335** ( Pt 1), 1-13.
- Colonnier, M.** (1968). Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* **9**, 268-87.
- Collins, C. A. and DiAntonio, A.** (2007). Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 35-42.
- Collins, C. A., Wairkar, Y. P., Johnson, S. L. and DiAntonio, A.** (2006). Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* **51**, 57-69.
- Cousin, M. A., Malladi, C. S., Tan, T. C., Raymond, C. R., Smillie, K. J. and Robinson, P. J.** (2003). Synapsin I-associated phosphatidylinositol 3-kinase mediates synaptic vesicle delivery to the readily releasable pool. *J Biol Chem* **278**, 29065-71.
- Cremona, O. and De Camilli, P.** (2001). Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* **114**, 1041-52.
- Cuesto, G., Enriquez-Barreto, L., Carames, C., Cantarero, M., Gasull, X., Sandi, C., Ferrus, A., Acebes, A. and Morales, M.** (2011). Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* **31**, 2721-33.
- Chasserot-Golaz, S., Coorssen, J. R., Meunier, F. A. and Vitale, N.** (2010). Lipid



dynamics in exocytosis. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 1335-42.

**Chen, K. and Featherstone, D. E.** (2005). Discs-large (DLG) is clustered by presynaptic innervation and regulates postsynaptic glutamate receptor subunit composition in *Drosophila*. *BMC Biol* **3**, 1.

**Chen, X., Garelick, M. G., Wang, H., Lil, V., Athos, J. and Storm, D. R.** (2005). PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. *Nat Neurosci* **8**, 925-31.

**Chua, J. J., Kindler, S., Boyken, J. and Jahn, R.** (2010). The architecture of an excitatory synapse. *J Cell Sci* **123**, 819-23.

**D'Angelo, G., Vicinanza, M., Wilson, C. and De Matteis, M. A.** (2012). Phosphoinositides in Golgi complex function. *Subcell Biochem* **59**, 255-70.

**DiAntonio, A.** (2006). Glutamate receptors at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* **75**, 165-79.

**DiAntonio, A., Haghighi, A. P., Portman, S. L., Lee, J. D., Amaranto, A. M. and Goodman, C. S.** (2001). Ubiquitination-dependent mechanisms regulate synaptic growth and function. *Nature* **412**, 449-52.

**DiAntonio, A. and Hicke, L.** (2004). Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu Rev Neurosci* **27**, 223-46.

**DiAntonio, A., Petersen, S. A., Heckmann, M. and Goodman, C. S.** (1999). Glutamate receptor expression regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* **19**, 3023-32.

**Diaz-Benjumea, F. J. and Hafen, E.** (1994). The sevenless signalling cassette mediates *Drosophila* EGF receptor function during epidermal development. *Development* **120**, 569-78.

**Eickholt, B. J., Walsh, F. S. and Doherty, P.** (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J Cell Biol* **157**, 211-7.

**Etter, P. D., Narayanan, R., Navratilova, Z., Patel, C., Bohmann, D., Jasper, H. and Ramaswami, M.** (2005). Synaptic and genomic responses to JNK and AP-1 signaling in *Drosophila* neurons. *BMC Neurosci* **6**, 39.

**Falasca, M. and Maffucci, T.** (2012). Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem J* **443**, 587-601.

**Fant, M. E., Nanu, L. and Word, R. A.** (1992). A potential role for endothelin-1 in human placental growth: interactions with the insulin-like growth factor family of peptides. *J Clin*

*Endocrinol Metab* **74**, 1158-63.

**Featherstone, D. E., Rushton, E., Rohrbough, J., Liebl, F., Karr, J., Sheng, Q., Rodesch, C. K. and Broadie, K.** (2005). An essential *Drosophila* glutamate receptor subunit that functions in both central neuropil and neuromuscular junction. *J Neurosci* **25**, 3199-208.

**Finley, D., Ciechanover, A. and Varshavsky, A.** (2004). Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell* **116**, S29-32, 2 p following S32.

**Forni, J. J., Romani, S., Doherty, P. and Tear, G.** (2004). Neuroglial and FasciclinII can promote neurite outgrowth via the FGF receptor Heartless. *Mol Cell Neurosci* **26**, 282-91.

**Fougerat, A., Gayral, S., Malet, N., Briand-Mesange, F., Breton-Douillon, M. and Laffargue, M.** (2009). Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis? *Clin Sci (Lond)* **116**, 791-804.

**Fouquet, W., Oswald, D., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Dyba, M., Hallermann, S., Kittel, R. J., Eimer, S. and Sigrist, S. J.** (2009). Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *J Cell Biol* **186**, 129-45.

**Frame, S. and Cohen, P.** (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* **359**, 1-16.

**Franco, B., Bogdanik, L., Bobinnec, Y., Debec, A., Bockaert, J., Parmentier, M. L. and Grau, Y.** (2004). Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila*. *J Neurosci* **24**, 6573-7.

**Franzdottir, S. R., Engelen, D., Yuva-Aydemir, Y., Schmidt, I., Aho, A. and Klammt, C.** (2009). Switch in FGF signalling initiates glial differentiation in the *Drosophila* eye. *Nature* **460**, 758-61.

**Frisch, A. and Wright, C. V.** (1998). XBMPRII, a novel *Xenopus* type II receptor mediating BMP signaling in embryonic tissues. *Development* **125**, 431-42.

**Fuger, P., Behrends, L. B., Mertel, S., Sigrist, S. J. and Rasse, T. M.** (2007). Live imaging of synapse development and measuring protein dynamics using two-color fluorescence recovery after photo-bleaching at *Drosophila* synapses. *Nat Protoc* **2**, 3285-98.

**Gass, P., Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Zacher, C., Strekalova, T., Kvello, A., Wagner, E. F. and Sprengel, R.** (2004). Mice with a fra-1 knock-in into the c-fos locus show impaired spatial but regular contextual learning and normal LTP. *Brain Res Mol Brain Res* **130**, 16-22.

**Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C. G., Kremmer, E., Hogg, N.,**

**Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K. S. et al.** (2000). Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J* **19**, 2525-36.

**Gindhart, J. G., Jr. and Kaufman, T. C.** (1995). Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene *Sex combs reduced*. *Genetics* **139**, 797-814.

**Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q. and Michelson, A. M.** (1996). *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **10**, 3003-17.

**Glazer, L. and Shilo, B. Z.** (1991). The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* **5**, 697-705.

**Glise, B., Bourbon, H. and Noselli, S.** (1995). *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* **83**, 451-61.

**Glise, B. and Noselli, S.** (1997). Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes Dev* **11**, 1738-47.

**Golembo, M., Raz, E. and Shilo, B. Z.** (1996). The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development* **122**, 3363-70.

**Gray, A., Van Der Kaay, J. and Downes, C. P.** (1999). The pleckstrin homology domains of protein kinase B and GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. *Biochem J* **344 Pt 3**, 929-36.

**Gray, E. G.** (1959). Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* **183**, 1592-3.

**Grenningloh, G., Bieber, A. J., Rehm, E. J., Snow, P. M., Traquina, Z. R., Hortsch, M., Patel, N. H. and Goodman, C. S.** (1990). Molecular genetics of neuronal recognition in *Drosophila*: evolution and function of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **55**, 327-40.

**Gryzik, T. and Muller, H. A.** (2004). FGF8-like1 and FGF8-like2 encode putative ligands of the FGF receptor Htl and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula. *Curr Biol* **14**, 659-67.

- Guo, Q., Xie, J., Dang, C. V., Liu, E. T. and Bishop, J. M.** (1998). Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9172-7.
- Gutierrez, R. C., Flynn, R., Hung, J., Kertesz, A. C., Sullivan, A., Zamponi, G. W., El-Husseini, A. and Colicos, M. A.** (2009). Activity-driven mobilization of post-synaptic proteins. *Eur J Neurosci* **30**, 2042-52.
- Hegde, A. N. and DiAntonio, A.** (2002). Ubiquitin and the synapse. *Nat Rev Neurosci* **3**, 854-61.
- Herman, P. K. and Emr, S. D.** (1990). Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 6742-54.
- Hicke, L. and Dunn, R.** (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-72.
- Hoang, B. and Chiba, A.** (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev Biol* **229**, 55-70.
- Huang, Y., Baker, R. T. and Fischer-Vize, J. A.** (1995). Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the fat facets gene. *Science* **270**, 1828-31.
- Hudson, J. B., Podos, S. D., Keith, K., Simpson, S. L. and Ferguson, E. L.** (1998). The *Drosophila* Medea gene is required downstream of dpp and encodes a functional homolog of human Smad4. *Development* **125**, 1407-20.
- Igaki, T., Pagliarini, R. A. and Xu, T.** (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1139-46.
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2700-4.
- Jope, R. S. and Johnson, G. V.** (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**, 95-102.
- Jordan-Alvarez, S., Fouquet, W., Sigrist, S. J. and Acebes, A.** (2012). Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of *Drosophila*. *J Cell Sci* **125**, 3621-9.
- Jung, H. and Holt, C. E.** (2011). Local translation of mRNAs in neural development. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 153-65.
- Kaufmann, N., DeProto, J., Ranjan, R., Wan, H. and Van Vactor, D.** (2002). *Drosophila* liprin-alpha and the receptor phosphatase Dlar control synapse morphogenesis. *Neuron* **34**, 27-38.

- Kawasaki, F., Felling, R. and Ordway, R. W.** (2000). A temperature-sensitive paralytic mutant defines a primary synaptic calcium channel in *Drosophila*. *J Neurosci* **20**, 4885-9.
- Keshishian, H. and Kim, Y. S.** (2004). Orchestrating development and function: retrograde BMP signaling in the *Drosophila* nervous system. *Trends Neurosci* **27**, 143-7.
- Khalsa, O., Yoon, J. W., Torres-Schumann, S. and Wharton, K. A.** (1998). TGF-beta/BMP superfamily members, Gbb-60A and Dpp, cooperate to provide pattern information and establish cell identity in the *Drosophila* wing. *Development* **125**, 2723-34.
- Khimich, D., Novian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E. D. and Moser, T.** (2005). Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* **434**, 889-94.
- Kidokoro, Y.** (2003). Roles of SNARE proteins and synaptotagmin I in synaptic transmission: studies at the *Drosophila* neuromuscular synapse. *Neurosignals* **12**, 13-30.
- Kim, S., Ko, J., Shin, H., Lee, J. R., Lim, C., Han, J. H., Altroch, W. D., Garner, C. C., Gundelfinger, E. D., Premont, R. T. et al.** (2003). The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix protein Piccolo. *J Biol Chem* **278**, 6291-300.
- Kim, T., Yoon, J., Cho, H., Lee, W. B., Kim, J., Song, Y. H., Kim, S. N., Yoon, J. H., Kim-Ha, J. and Kim, Y. J.** (2005). Downregulation of lipopolysaccharide response in *Drosophila* by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules. *Nat Immunol* **6**, 211-8.
- Kittel, R. J., Wichmann, C., Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D. A., Pawlu, C., Kellner, R. R., Willig, K. I. et al.** (2006). Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca<sup>2+</sup> channel clustering, and vesicle release. *Science* **312**, 1051-4.
- Klippel, A., Escobedo, M. A., Wachowicz, M. S., Apell, G., Brown, T. W., Giedlin, M. A., Kavanaugh, W. M. and Williams, L. T.** (1998). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* **18**, 5699-711.
- Koh, Y. H., Ruiz-Canada, C., Gorczyca, M. and Budnik, V.** (2002). The Ras1-mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway regulates synaptic plasticity through fasciclin II-mediated cell adhesion. *J Neurosci* **22**, 2496-504.
- Kroiher, M., Miller, M. A. and Steele, R. E.** (2001). Deceiving appearances: signaling by "dead" and "fractured" receptor protein-tyrosine kinases. *Bioessays* **23**, 69-76.
- Lahlou, H., Saint-Laurent, N., Esteve, J. P., Eyche, A., Pradayrol, L., Pyronnet, S. and Susini, C.** (2003). sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-,

and B-Raf-dependent ERK2 activation. *J Biol Chem* **278**, 39356-71.

**Lee, C. C., Huang, C. C., Wu, M. Y. and Hsu, K. S.** (2005). Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem* **280**, 18543-50.

**Lee, T., Hacohen, N., Krasnow, M. and Montell, D. J.** (1996). Regulated Breathless receptor tyrosine kinase activity required to pattern cell migration and branching in the *Drosophila* tracheal system. *Genes Dev* **10**, 2912-21.

**Leervers, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E. and Waterfield, M. D.** (1996). The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J* **15**, 6584-94.

**Li, A. J., Suzuki, S., Suzuki, M., Mizukoshi, E. and Imamura, T.** (2002). Fibroblast growth factor-2 increases functional excitatory synapses on hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* **16**, 1313-24.

**Liebl, F. L.** (2006). Highwire balances synaptic growth. *J Neurosci* **26**, 2143-4.

**Lin, C. H., Yeh, S. H., Lu, K. T., Leu, T. H., Chang, W. C. and Gean, P. W.** (2001). A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* **31**, 841-51.

**Lin, D. M. and Goodman, C. S.** (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**, 507-23.

**Liu-Yesucevitz, L., Bassell, G. J., Gitler, A. D., Hart, A. C., Klann, E., Richter, J. D., Warren, S. T. and Wolozin, B.** (2011). Local RNA translation at the synapse and in disease. *J Neurosci* **31**, 16086-93.

**Liu Ks Fau - Siebert, M., Siebert M Fau - Mertel, S., Mertel S Fau - Knoche, E., Knoche E Fau - Wegener, S., Wegener S Fau - Wichmann, C., Wichmann C Fau - Matkovic, T., Matkovic T Fau - Muhammad, K., Muhammad K Fau - Depner, H., Depner H Fau - Mettke, C., Mettke C Fau - Buckers, J. et al.** RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release.

**Loren, C. E., Scully, A., Grabbe, C., Edeen, P. T., Thomas, J., McKeown, M., Hunter, T. and Palmer, R. H.** (2001). Identification and characterization of DAlk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation in vivo. *Genes Cells* **6**, 531-44.

**Lucas, F. R., Goold, R. G., Gordon-Weeks, P. R. and Salinas, P. C.** (1998). Inhibition of GSK-3 $\beta$  leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling

induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* **111** ( Pt 10), 1351-61.

**MacDougall, L. K., Domin, J. and Waterfield, M. D.** (1995). A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr Biol* **5**, 1404-15.

**Man, H. Y., Wang, Q., Lu, W. Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T. P., Taghibiglou, C., Lu, J. et al.** (2003). Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **38**, 611-24.

**Marques, G.** (2005). Morphogens and synaptogenesis in *Drosophila*. *J Neurobiol* **64**, 417-34.

**Marques, G., Bao, H., Haerry, T. E., Shimell, M. J., Duchek, P., Zhang, B. and O'Connor, M. B.** (2002). The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron* **33**, 529-43.

**Marques, G., Haerry, T. E., Crotty, M. L., Xue, M., Zhang, B. and O'Connor, M. B.** (2003). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development* **130**, 5457-70.

**Marrus, S. B., Portman, S. L., Allen, M. J., Moffat, K. G. and DiAntonio, A.** (2004). Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* **24**, 1406-15.

**Martin-Pena, A., Acebes, A., Rodriguez, J. R., Sorribes, A., de Polavieja, G. G., Fernandez-Funez, P. and Ferrus, A.** (2006). Age-independent synaptogenesis by phosphoinositide 3 kinase. *J Neurosci* **26**, 10199-208.

**Martín - Peña, A.** (2007). Ultraestructura, desarrollo y función del cuerpo elipsoidal: Universidad Complutense de Madrid.

**Martinez-Padron, M. and Ferrus, A.** (1997). Presynaptic recordings from *Drosophila*: correlation of macroscopic and single-channel K<sup>+</sup> currents. *J Neurosci* **17**, 3412-24.

**Mason, I.** (2007). Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nat Rev Neurosci* **8**, 583-96.

**Massague, J.** (2008). A very private TGF-beta receptor embrace. *Mol Cell* **29**, 149-50.

**McCabe, B. D., Marques, G., Haghighi, A. P., Fetter, R. D., Crotty, M. L., Haerry, T. E., Goodman, C. S. and O'Connor, M. B.** (2003). The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* **39**, 241-54.

**McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-8.

**Mendoza-Topaz, C., Urrea, F., Barria, R., Albornoz, V., Ugalde, D., Thomas, U., Gundelfinger, E. D., Delgado, R., Kukuljan, M., Sanxaridis, P. D. et al.** (2008). DLGS97/SAP97 is developmentally upregulated and is required for complex adult behaviors and synapse morphology and function. *J Neurosci* **28**, 304-14.

**Meriggioli, M. N. and Sanders, D. B.** (2009). Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol* **8**, 475-90.

**Michelson, A. M., Gisselbrecht, S., Buff, E. and Skeath, J. B.** (1998). Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. *Development* **125**, 4379-89.

**Miller, M. A. and Steele, R. E.** (2000). Lemon encodes an unusual receptor protein-tyrosine kinase expressed during gametogenesis in *Hydra*. *Dev Biol* **224**, 286-98.

**Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R. J., Johnson, G. L. and Karin, M.** (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**, 1719-23.

**Miyazono, K., Maeda, S. and Imamura, T.** (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 251-63.

**Montgomery, J. M., Zamorano, P. L. and Garner, C. C.** (2004). MAGUKs in synapse assembly and function: an emerging view. *Cell Mol Life Sci* **61**, 911-29.

**Murthy, V., Han, S., Beauchamp, R. L., Smith, N., Haddad, L. A., Ito, N. and Ramesh, V.** (2004). Pam and its ortholog highwire interact with and may negatively regulate the TSC1.TSC2 complex. *J Biol Chem* **279**, 1351-8.

**Neuman-Silberberg, F. S., Schejter, E., Hoffmann, F. M. and Shilo, B. Z.** (1984). The *Drosophila* ras oncogenes: structure and nucleotide sequence. *Cell* **37**, 1027-33.

**Ohtsuka, T., Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K., Deguchi-Tawarada, M., Satoh, K., Morimoto, K., Nakanishi, H. et al.** (2002). Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* **158**, 577-90.

**Oishi, I., Sugiyama, S., Liu, Z. J., Yamamura, H., Nishida, Y. and Minami, Y.** (1997). A novel *Drosophila* receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. Unique structural features and implication in developmental signaling. *J Biol Chem* **272**, 11916-23.

**Opazo, P., Watabe, A. M., Grant, S. G. and O'Dell, T. J.** (2003). Phosphatidylinositol 3-



kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J Neurosci* **23**, 3679-88.

**Orme, M. H., Alrubaie, S., Bradley, G. L., Walker, C. D. and Leever, S. J.** (2006). Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **8**, 1298-302.

**Owald, D., Fouquet, W., Schmidt, M., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Christiansen, F., Zube, C., Quentin, C., Korner, J. et al.** (2010). A Syd-1 homologue regulates pre- and postsynaptic maturation in *Drosophila*. *J Cell Biol* **188**, 565-79.

**Owald, D., Khorramshahi, O., Gupta, V. K., Banovic, D., Depner, H., Fouquet, W., Wichmann, C., Mertel, S., Eimer, S., Reynolds, E. et al.** (2012). Cooperation of Syd-1 with Neurexin synchronizes pre- with postsynaptic assembly. *Nat Neurosci* **15**, 1219-26.

**Owald, D. and Sigrist, S. J.** (2009). Assembling the presynaptic active zone. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 311-8.

**Papadopoulos, D., Bianchi, M. W. and Bourouis, M.** (2004). Functional studies of shaggy/glycogen synthase kinase 3 phosphorylation sites in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **24**, 4909-19.

**Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P. and Boulianne, G. L.** (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* **19**, 171-4.

**Parnas, D., Haghighi, A. P., Fetter, R. D., Kim, S. W. and Goodman, C. S.** (2001). Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix. *Neuron* **32**, 415-24.

**Perkins, K. K., Admon, A., Patel, N. and Tjian, R.** (1990). The *Drosophila* Fos-related AP-1 protein is a developmentally regulated transcription factor. *Genes Dev* **4**, 822-34.

**Perron, J. C. and Dodd, J.** (2009). ActRIIA and BMPRII Type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis. *PLoS One* **4**, e8198.

**Petersen, S. A., Fetter, R. D., Noordermeer, J. N., Goodman, C. S. and DiAntonio, A.** (1997). Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila* reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron* **19**, 1237-48.

**Prober, D. A. and Edgar, B. A.** (2000). Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell* **100**, 435-46.

**Pulido, D., Campuzano, S., Koda, T., Modolell, J. and Barbacid, M.** (1992). Dtrk, a *Drosophila* gene related to the trk family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural

cell adhesion molecule. *EMBO J* **11**, 391-404.

**Purves, D. E.** (2004). Neuroscience, 3rd Edition: Sinauer Associates.

**Qin, G., Schwarz, T., Kittel, R. J., Schmid, A., Rasse, T. M., Kappei, D., Ponimaskin, E., Heckmann, M. and Sigrist, S. J.** (2005). Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J Neurosci* **25**, 3209-18.

**Radimerski, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., van der Kaay, J., Downes, C. P., Hafen, E. and Thomas, G.** (2002). dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nat Cell Biol* **4**, 251-5.

**Raftery, L. A. and Sutherland, D. J.** (1999). TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads. *Dev Biol* **210**, 251-68.

**Raftery, L. A., Twombly, V., Wharton, K. and Gelbart, W. M.** (1995). Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* **139**, 241-54.

**Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R. J., Mertel, S., Sigrist, C. B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G. et al.** (2005). Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 898-905.

**Reed, B. H., Wilk, R. and Lipshitz, H. D.** (2001). Downregulation of Jun kinase signaling in the amnioserosa is essential for dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* **11**, 1098-108.

**Reichman-Fried, M., Dickson, B., Hafen, E. and Shilo, B. Z.** (1994). Elucidation of the role of breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, in tracheal cell migration. *Genes Dev* **8**, 428-39.

**Reichman-Fried, M. and Shilo, B. Z.** (1995). Breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is required for the onset of tracheal cell migration and tracheole formation. *Mech Dev* **52**, 265-73.

**Renner, M., Specht, C. G. and Triller, A.** (2008). Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 532-40.

**Rewitz, K. F., Yamanaka, N., Gilbert, L. I. and O'Connor, M. B.** (2009). The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science* **326**, 1403-5.

**Richards, D. A., Rizzoli, S. O. and Betz, W. J.** (2004). Effects of wortmannin and latrunculin A on slow endocytosis at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* **557**, 77-91.

**Riesgo-Escovar, J. R. and Hafen, E.** (1997). Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science* **278**, 669-72.

**Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. and Hafen, E.** (1996). The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* **10**, 2759-68.

**Roberts, D. B.** (1986). *Drosophila a Practical Approach*: IRL Press, Oxford.

**Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. and Downward, J.** (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-32.

**Rohrbough, J. and Broadie, K.** (2010). Anterograde Jelly belly ligand to Alk receptor signaling at developing synapses is regulated by Mind the gap. *Development* **137**, 3523-33.

**Romero-Pozuelo, J., Dason, J. S., Atwood, H. L. and Ferrus, A.** (2007). Chronic and acute alterations in the functional levels of Frequentin 1 and 2 reveal their roles in synaptic transmission and axon terminal morphology. *Eur J Neurosci* **26**, 2428-43.

**Rubin, G. M.** (1988). *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* **240**, 1453-9.

**Salinas, P. C.** (2005). Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem Soc Trans* **33**, 1295-8.

**Sanna, P. P., Cammalleri, M., Berton, F., Simpson, C., Lutjens, R., Bloom, F. E. and Francesconi, W.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci* **22**, 3359-65.

**Sanyal, S., Sandstrom, D. J., Hoeffler, C. A. and Ramaswami, M.** (2002). AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. *Nature* **416**, 870-4.

**Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M.** (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-101.

**Schaefer, A. M., Hadwiger, G. D. and Nonet, M. L.** (2000). *rpm-1*, a conserved neuronal gene that regulates targeting and synaptogenesis in *C. elegans*. *Neuron* **26**, 345-56.

**Scheff, S. W. and Price, D. A.** (2006). Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Dis* **9**, 101-15.

**Schmid, A.** (2006). The role of glutamate receptors in formation and maturation of *Drosophila* neuromuscular synapses: Georg-August-Universität zu Göttingen.

**Schmid, A., Hallermann, S., Kittel, R. J., Khorramshahi, O., Frolich, A. M., Quentin, C., Rasse, T. M., Mertel, S., Heckmann, M. and Sigrist, S. J.** (2008). Activity-dependent site-

specific changes of glutamate receptor composition in vivo. *Nat Neurosci* **11**, 659-66.

**Schnorr, J. D. and Berg, C. A.** (1996). Differential activity of Ras1 during patterning of the *Drosophila* dorsoventral axis. *Genetics* **144**, 1545-57.

**Schoch, S. and Gundelfinger, E. D.** (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* **326**, 379-91.

**Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996a). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* **17**, 641-54.

**Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996b). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron* **17**, 655-67.

**Sen, A., Yokokura, T., Kankel, M. W., Dimlich, D. N., Manent, J., Sanyal, S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (2011). Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila* links Smn to FGF signaling. *J Cell Biol* **192**, 481-95.

**Serra-Pages, C., Kedersha, N. L., Fazikas, L., Medley, Q., Debant, A. and Streuli, M.** (1995). The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *EMBO J* **14**, 2827-38.

**Servant, G., Weiner, O. D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W. and Bourne, H. R.** (2000). Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**, 1037-40.

**Sheng, M. and Hoogenraad, C. C.** (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* **76**, 823-47.

**Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y. and Saigo, K.** (1993). Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* **117**, 751-61.

**Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D. C., Wilson, C., Davis, R. J. and Ip, Y. T.** (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**, 2745-58.

**Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M. and Levine, M.** (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **18**, 687-99.

**Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C. and Hawkins, P. T.** (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G

protein beta gamma subunits. *Cell* **77**, 83-93.

**Sudhof, T. C.** (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509-47.

**Sui, X., Li, D., Qiu, H., Gaussin, V. and Depre, C.** (2009). Activation of the bone morphogenetic protein receptor by H11kinase/Hsp22 promotes cardiac cell growth and survival. *Circ Res* **104**, 887-95.

**Sun, B. and Salvaterra, P. M.** (1995). Characterization of nervana, a *Drosophila melanogaster* neuron-specific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. *J Neurochem* **65**, 434-43.

**Sutherland, D., Samakovlis, C. and Krasnow, M. A.** (1996). branchless encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**, 1091-101.

**Thomas, U., Kobler, O. and Gundelfinger, E. D.** (2010). The *Drosophila* larval neuromuscular junction as a model for scaffold complexes at glutamatergic synapses: benefits and limitations. *J Neurogenet* **24**, 109-19.

**Tohda, C., Nakanishi, R. and Kadowaki, M.** (2006). Learning deficits and agenesis of synapses and myelinated axons in phosphoinositide-3 kinase-deficient mice. *Neurosignals* **15**, 293-306.

**Uthaman, S. B., Godenschwege, T. A. and Murphey, R. K.** (2008). A mechanism distinct from highwire for the *Drosophila* ubiquitin conjugase bendless in synaptic growth and maturation. *J Neurosci* **28**, 8615-23.

**Valius, M. and Kazlauskas, A.** (1993). Phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* **73**, 321-34.

**Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J. and Waterfield, M. D.** (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**, 535-602.

**Vanhaesebroeck, B., Stephens, L. and Hawkins, P.** (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 195-203.

**Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Durrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M. C., Schmidt, M., Qin, G. et al.** (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* **49**, 833-44.

**Walker, E. H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L. and Williams, R. L.** (1999). Structural

insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* **402**, 313-20.

**Wan, H. I., DiAntonio, A., Fetter, R. D., Bergstrom, K., Strauss, R. and Goodman, C. S.** (2000). Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **26**, 313-29.

**Wang, X., Sun, B., Yasuyama, K. and Salvaterra, P. M.** (1994). Biochemical analysis of proteins recognized by anti-HRP antibodies in *Drosophila melanogaster*: identification and characterization of neuron specific and male specific glycoproteins. *Insect Biochem Mol Biol* **24**, 233-42.

**Wassarman, D. A., Therrien, M. and Rubin, G. M.** (1995). The Ras signaling pathway in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 44-50.

**Wen, P. J., Osborne, S. L., Zanin, M., Low, P. C., Wang, H. T., Schoenwaelder, S. M., Jackson, S. P., Wedlich-Soldner, R., Vanhaesebroeck, B., Keating, D. J. et al.** (2011). Phosphatidylinositol(4,5)bispophosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat Commun* **2**, 491.

**Wennstrom, S. and Downward, J.** (1999). Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **19**, 4279-88.

**Wharton, K. A., Cook, J. M., Torres-Schumann, S., de Castro, K., Borod, E. and Phillips, D. A.** (1999). Genetic analysis of the bone morphogenetic protein-related gene, *gbp*, identifies multiple requirements during *Drosophila* development. *Genetics* **152**, 629-40.

**Wilson, D. M., 3rd, Deutsch, W. A. and Kelley, M. R.** (1994). *Drosophila* ribosomal protein S3 contains an activity that cleaves DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem* **269**, 25359-64.

**Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J.** (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341-7.

**Wu, C., Wairkar, Y. P., Collins, C. A. and DiAntonio, A.** (2005). Highwire function at the *Drosophila* neuromuscular junction: spatial, structural, and temporal requirements. *J Neurosci* **25**, 9557-66.

**Yart, A., Roche, S., Wetzker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap, H. and Raynal, P.** (2002). A function for phosphoinositide 3-kinase beta lipid products in coupling beta gamma to Ras activation in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **277**, 21167-78.

**Yoshimura, T., Arimura, N. and Kaibuchi, K.** (2006). Signaling networks in neuronal polarization. *J Neurosci* **26**, 10626-30.

**Yu, Y., Nomikos, M., Theodoridou, M., Nounesis, G., Lai, F. A. and Swann, K.** (2012).

PLCzeta causes  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane  $\text{PI}(4,5)\text{P}(2)$ . *Mol Biol Cell* **23**, 371-80.

**Zhai, R. G. and Bellen, H. J.** (2004). The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)* **19**, 262-70.

**Zhen, M. and Jin, Y.** (1999). The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans*. *Nature* **401**, 371-5.

**Zu, K., Sikes, M. L. and Beyer, A. L.** (1998). Separable roles in vivo for the two RNA binding domains of *Drosophila* A1-hnRNP homolog. *RNA* **4**, 1585-98.





## **ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS**



# Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of *Drosophila*

Sheila Jordán-Álvarez<sup>1</sup>, Wernher Fouquet<sup>2,3</sup>, Stephan J. Sigrist<sup>2,3</sup> and Angel Acebes<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Cajal Institute, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ave. Dr. Arce 37, Madrid 28002, Spain

<sup>2</sup>Neurocure, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

<sup>3</sup>Institute for Biology/Genetics, Free University Berlin, 14195 Berlin, Germany

\*Author for correspondence (a.acebes@cajal.csic.es)

Accepted 19 March 2012

Journal of Cell Science 125, 3621–3629

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.102806

## Summary

Synapse transmission depends on the precise structural and functional assembly between pre- and postsynaptic elements. This tightly regulated interaction has been thoroughly characterised *in vivo* in the *Drosophila* glutamatergic larval neuromuscular junction (NMJ) synapse, a suitable model to explore synapse formation, dynamics and plasticity. Previous findings have demonstrated that presynaptic upregulation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) increases synapse number, generating new functional contacts and eliciting changes in behaviour. Here, we show that genetically driven overexpression of PI3K in the presynaptic element also leads to a correlated increase in the levels of glutamate receptor (GluRII) subunits and the number of postsynaptic densities (PSDs), without altering GluRII formation and assembly dynamics. In addition to GluRIIs, presynaptic PI3K activity also modifies the expression of the postsynaptic protein Discs large (Dlg). Remarkably, PI3K specifically overexpressed in the final larval stages is sufficient for the formation of NMJ synapses. No differences in the number of synapses and PSDs were detected when PI3K was selectively expressed in the postsynaptic compartment. Taken together, these results demonstrate that PI3K-dependent synaptogenesis plays an instructive role in PSD formation and growth from the presynaptic side.

**Key words:** Synapse, PI3K, Glutamate receptors, NMJ, *Drosophila*

## Introduction

Synapses represent the major structural and functional contact points between neurons. These structures couple the neurotransmitter release machinery (in the presynaptic cell) with the neurotransmitter receptor complexes (in the postsynaptic cell). The *Drosophila* larval neuromuscular junction (NMJ) is suitable to dissect the molecular mechanisms controlling synaptic morphology and plasticity due to its accessibility to perform electrophysiology, immunohistochemistry, live imaging or electron microscopy (Collins and DiAntonio, 2007; Oswald and Sigrist, 2009). Similar to vertebrate synapses in the central nervous system (CNS), the *Drosophila* NMJ is glutamatergic. The projection pattern of each single motor neuron innervating the larval body wall muscles is fully characterised (Hoang and Chiba, 2001), as well as the formation and maturation of the synapse (Fouquet et al., 2009; Oswald et al., 2010; Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). The NMJ postsynaptic sides express non-NMDA receptors, homologous to vertebrate non-NMDA ionotropic receptors (DiAntonio et al., 1999; Schuster et al., 1991), which mediate fast excitatory transmission (Dingledine et al., 1999). Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) concentrate in the postsynaptic density (PSD), a dense specialisation attached to the postsynaptic membrane, opposite to presynaptic neurotransmitter release sites, also known as active zones (Ziff, 1997). These receptors exhibit five subunits, GluRIIA to GluRIIE (DiAntonio, 2006; DiAntonio et al., 1999; Featherstone et al.,

2005; Marrus et al., 2004; Petersen et al., 1997; Qin, G. et al., 2005), although a functional receptor can be formed with either GluRIIA or GluRIIB (DiAntonio et al., 1999).

Out of the extensive number of studies on the larval NMJ model, especially relevant here are works focusing on the interaction between the presynaptic neurotransmitter release sites and their opposed glutamate receptor clusters at the postsynaptic site. Thus, while GluRIIA levels are higher than those of GluRIIB at immature PSDs, GluRIIB is prevalent at mature PSDs (Schmid et al., 2008). Conversely, in the presynaptic compartment, synapse stability and function depends on the proper assembly of the active zone (AZ), the cytoplasmic matrix at the active zone (CAZ) and the large proteinaceous scaffold (Oswald and Sigrist, 2009; Siksou et al., 2007). Genetic analyses have shown that the gene *Shaggy/GSK3* (homologue of mammalian glycogen synthase kinase 3 beta, *GSK3B*) regulates negatively the growth of the NMJ only when expressed in motor neurons, but not in muscles (Franco et al., 2004). In the same context, the overexpression of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in larval motor neurons increases the number of functional synapses in a cell-autonomous manner (Martín-Peña et al., 2006). Recently, the synaptogenic activity of PI3K has been demonstrated in mammals, being able to induce behavioural changes in the memory performance of rats (Cuesto et al., 2011).

Here, we address the dynamics of synapse growth and GluRII subunit composition under conditions of presynaptic- and

postsynaptic-induced changes in PI3K expression. The data demonstrate an increase in the number of PSDs only when PI3K is overexpressed presynaptically.

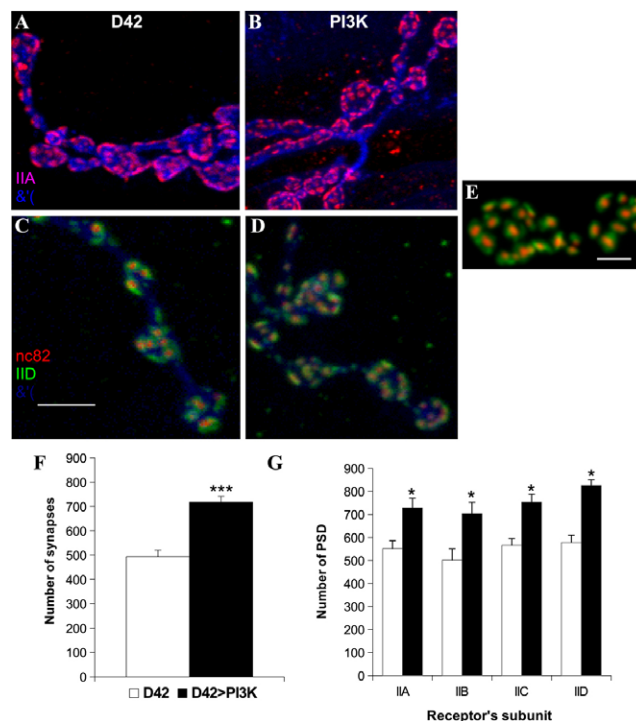
## Results

### Presynaptic PI3K overexpression increases PSD number per NMJ

In *Drosophila*, PI3K overexpression leads to an increase in the number of functional synapses in larval motor neurons (Martín-Peña et al., 2006). Due to this synaptogenic effect, we first investigated whether increasing PI3K levels also exerts a possible influence on postsynaptic receptors. Under electron microscopy, the glutamate receptors form an electron dense compartment, the postsynaptic density (PSD), a key structure for the stabilisation and dynamic regulation of neurotransmitter receptor populations (Renner et al., 2008). To perform our analysis we focused on the well characterised RP3 motor neuron innervating muscles 6/7 of abdominal segment 3 (A3) from the third instar larvae. Synapse identification and counting were achieved by double immunostaining with anti-HRP antibody, to visualise neuronal membranes (Jan and Jan, 1982), and with the monoclonal antibody nc82 to recognise Brp (Bruchpilot), a synaptic protein (Rasse et al., 2005; Wagh et al., 2006). To label and quantify postsynaptic densities (PSDs), we applied antibodies against the non-essential glutamate receptor subunits A, B (GluRIIA and GluRIIB) and also against two of the fundamental subunits C and D (GluRIIC and GluRIID) (DiAntonio, 2006).

We confirmed here that larvae overexpressing PI3K in presynaptic motor neurons (*D42-Gal4/UAS-PI3K*) form more synapses than controls (*D42-Gal4*) by the criterion of nc82-positive staining (Martín-Peña et al., 2006), and also by counting Brp-positive spots detected with a second antibody (anti-Brp) (Fig. 1A; Table 1). Both markers identify different amino acid residues of the BRP protein (Fouquet et al., 2009). In addition, we evaluated the effects at the postsynaptic density by immunostaining against the four different GluRII subunits (A–D) and counting immunopositive punctae as a direct estimation of PSD number (Fig. 1A–D). We found that overexpressing PI3K in motor neurons leads to an increase of  $32 \pm 7\%$  in the IIA subunit,  $40 \pm 10\%$  in IIB,  $33 \pm 6\%$  for IIC and  $43 \pm 4\%$  for IID subunits (Fig. 1F; Table 1). In a second series of experiments, we questioned whether the downregulation of PI3K levels, by using the presynaptic overexpression of a PI3K dominant negative construct (Leevers et al., 1996), alters synapse and PSDs numbers. The data show a significant decrease in synapse number in *D42-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* larvae:  $400 \pm 25$  synapses ( $n=9$ ) when compared with control *D42-Gal4* larvae:  $548 \pm 38$  synapses ( $n=9$ ) (supplementary material Fig. S1C). We also detected a reduction in the number of PSDs visualised by the GluRIID antibody in *PI3K<sup>DN</sup>* larvae:  $477 \pm 40$  ( $n=10$ ) versus *D42-Gal4* larvae:  $618 \pm 48$  ( $n=9$ ) (supplementary material Fig. S1D). Together, these data demonstrate that PI3K overexpressed presynaptically elicits changes in the number of postsynaptic glutamate receptor fields, in accordance with the observed increase in synapse number.

We then asked whether the increase in the number of postsynaptic receptors would be accompanied by a presynaptic PI3K-dependent effect. To this end, we quantified by western blot the changes in expression level of GluRIIA. These data are relevant because GluRIIA levels are higher compared with the other subunits at the developing, immature PSDs (Schmid et al.,



**Fig. 1. Effect of presynaptic PI3K overexpression on GluRII expression.**

Representative Z-projection confocal images showing double immunostaining for GluRIIA (red) and HRP (blue) to visualise and count PSDs in (A) control *D42-Gal4* and (B) *D42-GAL/UAS-PI3K* RP3 larval motor neurons innervating muscles fibres 6/7. Confocal planes of control *D42-Gal4* (C) and *D42-GAL/UAS-PI3K* RP3 (D) motor neurons labelled for nc82 (red), GluRIID (green) and HRP (blue) that allow counting synapses, glutamate receptor D subunits and boutons, respectively. (E) High magnification of a single bouton taken from a control RP3 motor neuron. Note the apposition between nc82 (presynaptic) and GluRIID (postsynaptic) signals. (F) Histogram showing the absolute number of synapses between control and experimental genotypes. Note the significant increase in synapse number in PI3K-overexpressing larvae. \*\*\* $P < 0.0005$ . (G) Histogram showing the absolute number of PSDs counted after immunostaining against the A, B, C and D GluRII subunits. There is a PSDs number augmentation detected with all GluRII antibodies in PI3K larvae. We found no statistical differences when we compared PSD numbers between all GluRII subunits, either in control ( $P=0.55$ , ANOVA test) or in PI3K ( $P=0.12$ , ANOVA test) individuals. For all genotypes, 10–12 larvae were analysed. \* $P < 0.05$  or higher. Scale bar: 3  $\mu\text{m}$  (A–D) and 1  $\mu\text{m}$  (E).

2008). In these experiments we processed fillets from third instar larvae expressing the pan-neural *elav-Gal4* driver as a control (Lin and Goodman, 1994), *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* as experimental genotypes. As an additional control we also expressed a *UAS-GluRIIA<sup>RNAi</sup>* construct in the *elav* domain (data not shown). Using an antibody specific for GluRIIA, we found that PI3K upregulation leads to an increase of  $42 \pm 20\%$  in the GluRIIA subunit levels, compared to control larvae ( $n=5$  independent western blots for each genotype, three larvae per lane) (Fig. 2A,B). However, the downregulation of PI3K does not seem to affect GluRIIA levels ( $n=5$ , three larvae per lane) (Fig. 2A,B). We have also performed western blot quantifications from *elav-Gal4*, *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* third instar larval brains (supplementary Fig. S2). The data show a moderated increase of  $24 \pm 6\%$  in

**Table 1. Number of synapses and postsynaptic densities**

	nc82 <sup>+</sup> synapses	Brp <sup>+</sup> synapses	GluRIIA PSDs	GluRIIB PSDs	GluRIIC PSDs	GluRIID PSDs
D42	493±27	567±75	552±34	502±49	567±29	578±33
D42>PI3K	718±25	903±50	729±41	703±49	753±34	826±25
Difference	Δ1.46*	Δ1.59*	Δ1.32*	Δ1.40*	Δ1.33*	Δ1.43*

\* $P<0.05$  or higher.

GluRIIA levels in *elav-Gal4/UAS-PI3K* (supplementary material Fig. S2). Furthermore, we also detected a 40% decrease in GluRIIA in larval brains expressing an RNAi construct against GluRIIA (data not shown). All these data indicate that the presynaptic PI3K overexpression, but not its downregulation, is able to modify the levels of GluRIIA in the postsynaptic compartment.

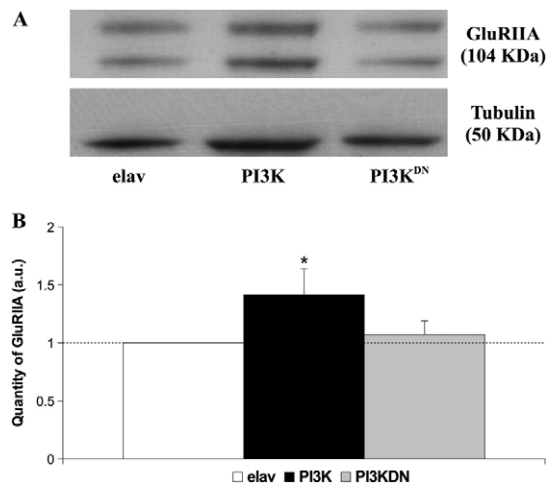
### Presynaptic PI3K differentially affects the expression of DLG

We quantified the expression changes of another postsynaptic protein, Discs large (Dlg), a protein essential for the architecture of excitatory synapses in mammals (Montgomery et al., 2004; Parnas et al., 2001). In *Drosophila*, Dlg expression is restricted to postsynaptic areas, and it is implicated in the clustering of receptors that contain GluRIIB, but not GluRIIA (Chen and Featherstone, 2005; Thomas et al., 2010). Here, we observed possible changes in Dlg expression with an antibody recognising the two Dlg isoforms: DlgA and DlgS97 (Mendoza-Topaz et al., 2008) (Fig. 3A). To this end, we analysed western blots from *elav-Gal4*, *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* genotypes. The data indicate that the upregulation of PI3K causes an increase of  $83\pm31\%$  in the DlgA isoform levels

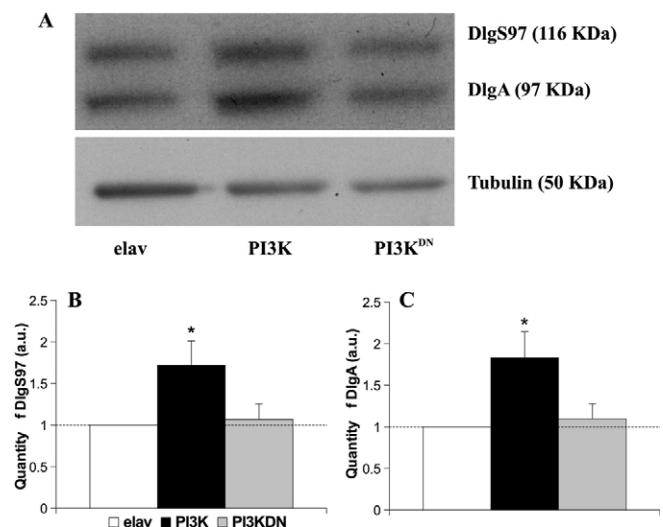
(Fig. 3B) and  $72\pm29\%$  in DlgS97 isoform (Fig. 3C) ( $n=5$  in each genotype, three third instar larval fillets per lane). In turn, the reduction of PI3K causes no differences in any of the two Dlg isoforms (Fig. 3B,C). Both sets of data are reproduced when Dlg proteins levels were quantified in *elav-Gal4*, *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* third instar larval brains (supplementary material Fig. S3). Thus, we observed increases of  $14\pm7\%$  in DlgA and  $15\pm7\%$  of DlgS97 isoforms in *elav-Gal4/UAS-PI3K* brains and no level changes *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* when compared with the control. In parallel, larval brains expressing the *UAS-Dlg<sup>RNAi</sup>* construct elicited a 20% reduction for both Dlg proteins (data not shown) in agreement with previous observations (Mendoza-Topaz et al., 2008). Taken together, these results indicate that PI3K from the presynaptic side modify the amount of Dlg protein isoforms in the developing NMJ.

### The dynamics of glutamate receptor incorporation into PSD is independent of changes in PI3K levels

We next tested the possible involvement of PI3K in the PSD dynamics for GluRs. To this end, we performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments in the larval



**Fig. 2. PI3K-dependent regulation of GluRIIA levels.** (A) Representative immunoblot indicating GluRIIA levels in *elav-Gal4* control, *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* larval fillets. This GluRIIA antibody recognises two bands with a lower band corresponding to the estimated GluRIIA molecular mass (104 KDa). The upper band could be due to post-translational modification. (B) Summary graph showing GluRIIA levels quantified and normalised to tubulin in each genotype. The graph represents the average of five western blot experiments. Note the increase of 42% in the level of GluRIIA in PI3K overexpressing larval brains. No differences are observed when PI3K<sup>DN</sup> is upregulated in larval fillets ( $n=3$  larval fillets per genotype,  $n=5$  independent western blots). a.u., arbitrary units. \* $P<0.05$ .



**Fig. 3. Effect of PI3K and PI3K<sup>DN</sup> overexpression on Dlg levels.**

(A) Representative western blot showing Dlg protein levels in control *elav-Gal4*, *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* larval fillets. The Dlg antibody recognises two isoforms of the protein: DlgS97 (116 KDa) and DlgA (97 KDa). (B) Histogram showing the quantification of DlgS97 for the three genotypes. Note that DlgS97 exhibits increased levels (83%) only when PI3K is overexpressed. (C) Graph of DlgA levels for the same genotypes. DlgA levels significantly increase (72%) when PI3K is overexpressed. No detectable changes are observed when PI3K is downregulated (PI3K<sup>DN</sup>). The quantity of both Dlg isoforms in each genotype was normalised to Tubulin ( $n=3$  larval fillets per lane,  $n=5$  independent western blots). \* $P<0.05$ .



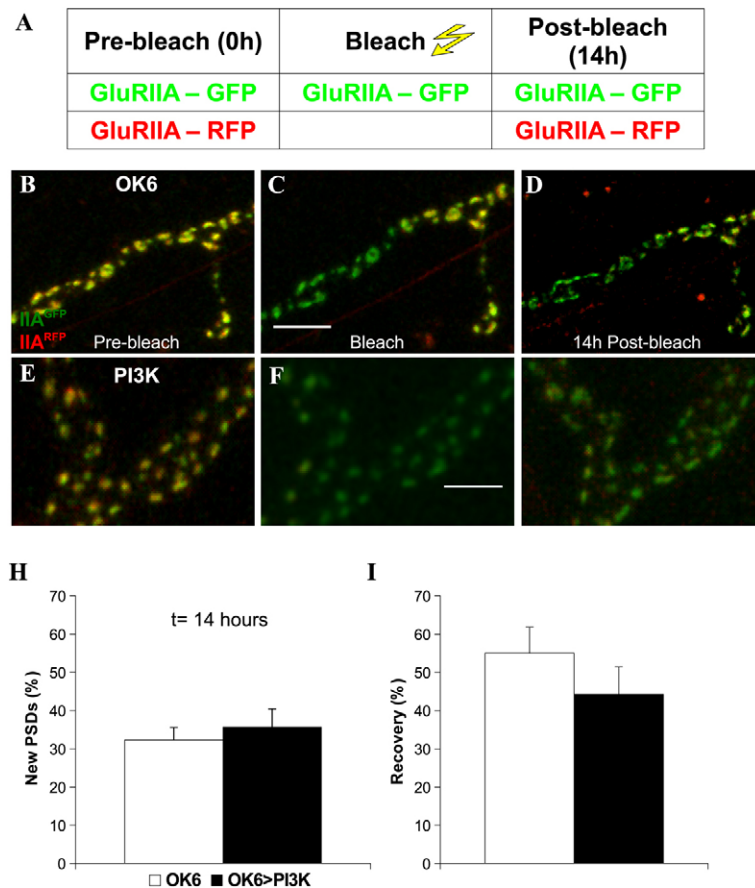
NMJ (Rasse et al., 2005). FRAP demonstrated previously that GluRIIA subunit entry was directly related to PSD formation and growth (Owald and Sigrist, 2009; Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). GluR dynamics during formation and maturation of PSDs have been imaged in larvae carrying GluRIIA constructs tagged with green fluorescent protein (GluRIIA<sup>GFP</sup>) and red fluorescent protein (GluRIIA<sup>RFP</sup>) markers inserted in the intracellular C-terminal of GluRIIA to allow endogenous expression (Rasse et al., 2005). Thus, the recovery of GluRIIA<sup>RFP</sup> fluorescence after its specific bleaching allows the quantification of glutamate receptor incorporation into the PSDs of the growing larvae, whereas GluRIIA<sup>GFP</sup> signal is monitored as an internal control of PSD formation ('steady state channel'). We generated larvae in which PI3K is selectively expressed in motor neurons, using the *OK6-Gal4* line (Aberle et al., 2002). This line is expressed in all motor neurons, but we focused in muscle 27 and 26 due to their easier accessibility. These muscles are located in the ventral part of larvae musculature close to the cuticle, allowing a better observation of the fluorescence *in vivo* (Hoang and Chiba, 2001; Rasse et al., 2005).

Individual NMJs were imaged at three different time-points used: Pre-bleach (0 hours), Bleach (photobleaching of GluRIIA<sup>RFP</sup>) and Post-bleach (14 hours after GluRIIA<sup>RFP</sup> bleaching) for each genotype (Fig. 4A–G). 14 hours later, we quantified the number of new PSDs formed after photobleaching in muscle 27. Our data indicates no differences between control larvae (*OK6-Gal4*,  $32 \pm 3\%$ ,  $n=10$ ) and those overexpressing PI3K (*OK6-Gal4/UAS-PI3K*,  $36 \pm 5\%$ ,  $n=12$ ) (Fig. 4H). Next, we estimated the percentage of recovery by measuring

differences in the GluRIIA<sup>RFP</sup> signal intensity in the bleached area compared with the unbleached area 14 hours after photobleaching the NMJ (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). Again, there were no statistically significant differences in GluRIIA<sup>RFP</sup> signal recovery between control ( $52 \pm 12\%$ ) and experimental ( $39 \pm 6\%$ ) groups (Fig. 4I). Collectively, our data show that PI3K upregulation does not alter the dynamics of GluR incorporation during PSDs formation. Instead, the system seems to trigger the formation of additional synapses, with GluR incorporation at individual PSDs operating normally. Consistent with the larger number of PSDs, the overall amounts of GluRIIA per terminal were also increased.

#### Presynaptic PI3K activation is sufficient to elicit changes in synapse and PSDs number

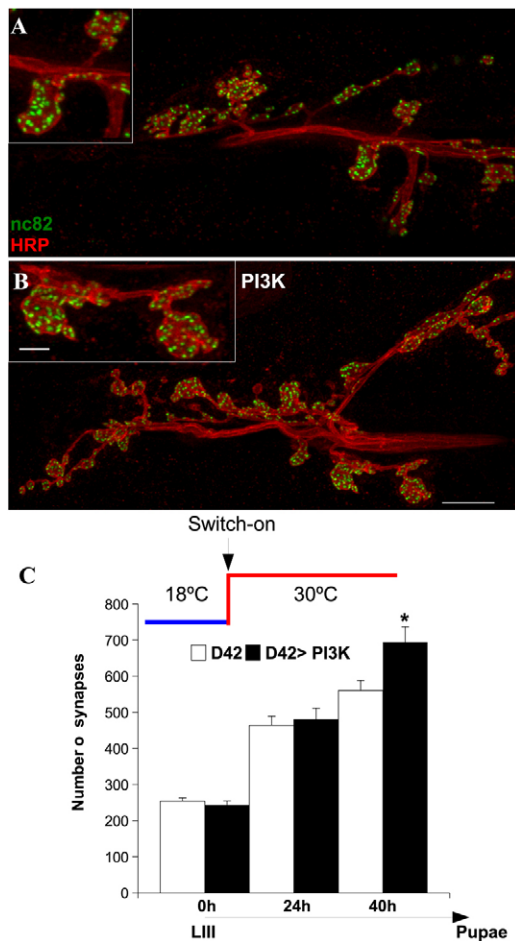
In the previous experiments, PI3K activity was chronically up- or downregulated after embryogenesis. It could be argued that the observed PI3K-dependent changes in synapse and PSDs number could result from synaptic rearrangements produced along developmental stages. To investigate this possibility, we performed experiments allowing temporal control of the driver activation by using a temperature-sensitive form of the *Gal4* inhibitor, *Gal80<sup>ts</sup>* (McGuire et al., 2003). Thus, when we raised embryo and larvae at 18°C, *Gal80<sup>ts</sup>* repressed *Gal4*, preventing PI3K overexpression. At early third instar larvae, temperature was shifted to 30°C and *Gal4* repression was abolished allowing selective PI3K overexpression in larval motor neurons. The system needs at least 6 hours to have full *Gal4* protein expression detected by a *CD8-GFP* reporter (data not shown). In these



**Fig. 4. PI3K involvement in GluRIIA dynamics.** (A) FRAP protocol was performed on larvae carrying two tagged GluRIIA constructs endogenously expressing both RFP (red) and GFP (green) markers. Photobleaching was selectively applied to the red wavelength, leaving the green channel unaffected as a reference. After bleaching, the GluRIIA<sup>RFP</sup> signal recovery were visualised and analysed after 14 hours. (B–D) Representative images during (B) pre-bleaching, (C) after bleaching of the RFP signal, and (D) 14 hours post-bleaching in an *OK6-Gal4* larval motor neuron. (E–G) Equivalent images corresponding to the same neuron in an *OK6-Gal4/UAS-PI3K* larva. (H) Entry of GluRIIA<sup>RFP</sup> signal at individual PSDs after photobleaching versus GluRIIA<sup>GFP</sup> signal indicates new PSD formation over 14 hours represented as the percentage of increment of PSD. (I) Graph representing the percentage of recovery calculated as the difference between the bleached area and several surrounding unbleached areas in the corresponding NMJ. All the experiments were carried out in the motor neuron innervating fibres 26 and 27. Scale bars: 5  $\mu$ m (B–D) and 3  $\mu$ m (E–G).

experiments, we considered three data and time points: before PI3K expression (0h), 24 hours after temperature shift to 30°C (24h) and 40 hours at 30°C (40h).

Synapse numbers were counted after double immunostaining with nc82 and HRP antibodies in larval muscles 6–7 in control (Fig. 5A) and PI3K larvae (Fig. 5B). Data indicate that 24 hours after the ‘switch-on’ protocol, both control ( $n=8$ ) and PI3K overexpressing ( $n=9$ ) larvae showed increased synapse number (83% and 99%, respectively). Although this increment tended to be higher in PI3K-overexpressing larvae compared with controls, we did not observe statistical differences between both groups ( $P=0.6954$ ), probably due to an insufficient PI3K activation



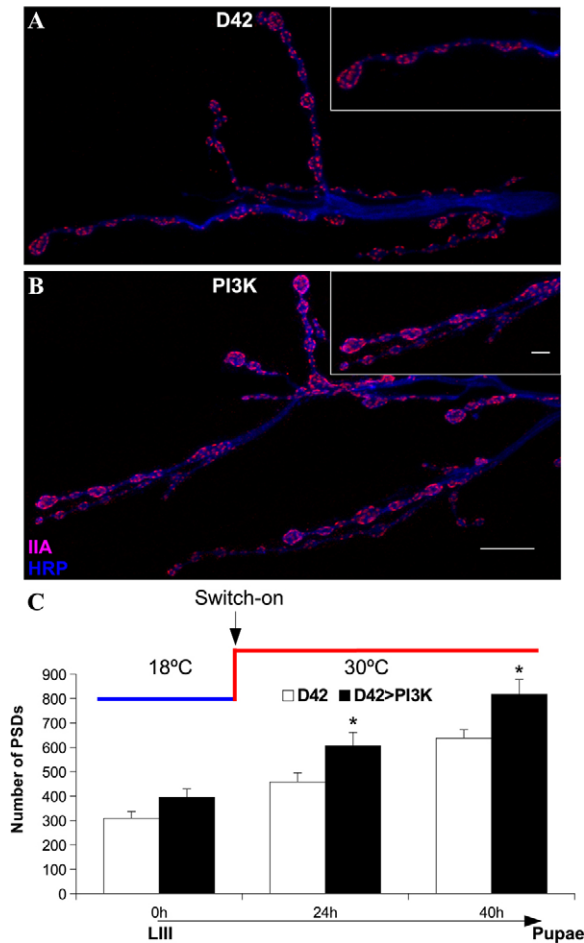
**Fig. 5. Larval PI3K activation modifies synapse number.** Representative confocal sections of (A) *D42-Gal4* and (B) *D42-Gal4/UAS-PI3K* motor neurons immunolabelled for nc82 (green) and HRP (red). Inserts in A and B represent high-magnification images of selected boutons. (C) The changes in synapse number during third instar larvae before and after PI3K activation. *D42-Gal4* and *D42-Gal4/UAS-PI3K* larvae carrying the temperature-dependent *Gal4* repressor *Gal80<sup>ts</sup>* were raised at 18°C until third instar larval stage. At this temperature, *Gal4* expression is abolished. Temperature was then switched to 30°C at day 1 of LIII stage. At this temperature, *Gal80<sup>ts</sup>* repressor is inhibited, allowing *Gal4* and also PI3K expression along third instar larval development. Statistically significant differences were observed in PI3K overexpressing larvae ( $694 \pm 43$  synapses,  $n=12$ ) only at 40 hours after *Gal4* activation compared with control ( $560 \pm 28$  synapses,  $n=10$ ) larvae. LIII, third instar larvae. \* $P < 0.05$ . Scale bars: 10  $\mu$ m (A,B) and 3  $\mu$ m (inserts in A,B).

(Fig. 5A). However, after 40 hours at 30°C, PI3K larvae showed a statistically significant increase in synapse number compared with control larvae. The data values were  $560 \pm 27$  ( $n=10$ ) and  $694 \pm 43$  ( $n=12$ ) synapses in control and PI3K larvae, respectively (Fig. 5A). Also, we repeated the same experiment in *D42-Gal4/UAS PI3K<sup>DN</sup>* larvae quantifying the number of synapses. We found a decrease in the number of synapses in *D42-Gal4/UAS PI3K<sup>DN</sup>*:  $437 \pm 40$  synapses ( $n=10$ ) compared with *D42-Gal4*:  $542 \pm 35$  synapses ( $n=11$ ) (supplementary material Fig. S4). Taken together, these results demonstrate that the presence of high levels of PI3K during third instar larvae is sufficient to trigger NMJ synaptogenesis.

As shown above, the PI3K-dependent increase in synapse number correlates with increments in the number of glutamate receptor subunits and, hence, PSDs (Fig. 1). To further investigate this finding, we expressed PI3K under the control of *D42-Gal4* only in third instar larvae using the *Gal80<sup>ts</sup>* system, and quantified the number of PSDs. As in the previous experiment, we considered three time points: 0 hours before PI3K expression, 24 hours after temperature shift to 30°C (24h) and 40 hours at 30°C (40h). PSDs were labelled by co-immunostaining with anti-GluRIIA and anti-HRP (Fig. 6A,B). The data show that 24 hours after ‘switching-on’ the system, the overexpression of PI3K ( $606 \pm 55$ ,  $n=10$ ) increased the number of PSDs with respect to the control *D42-Gal4* larvae ( $458 \pm 38$ ,  $n=9$ ) (Fig. 6C). This augmentation occurs even prior to the increase in the number of synapses (by the criterion of nc82 antigen visualisation). This is in agreement with data showing that GluRIIA receptors cluster previously to the incorporation of Brp into the growing synapses (Fouquet et al., 2009, Oswald et al., 2010). This increase in PSD number is maintained at 40 hours after PI3K expression (*D42-Gal4/UAS-PI3K* larvae,  $817 \pm 61$ ,  $n=11$ ; *D42-Gal4* larvae:  $637 \pm 35$ ,  $n=8$ ) (Fig. 6C). Conversely, we observed a significant decrease in the number of PSDs at 40 hours after PI3K<sup>DN</sup> overexpression in *D42-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* ( $444 \pm 29$ ,  $n=5$ ) versus *D42-Gal4* ( $619 \pm 42$ ,  $n=5$ ) larvae (supplementary material Fig. S4). The consistency of all these data sets demonstrates that presynaptic PI3K is necessary for both the formation of new synapses and nascent PSDs in the growing NMJ.

#### Synapse and PSD numbers are not altered when PI3K is expressed postsynaptically

Previous electrophysiological recordings obtained on motor neurons overexpressing PI3K indicated an increase in frequency and amplitude of miniature endplate potentials (MEPPs, spontaneous release), whereas the evoked release produced only an increase in EPSP amplitude (Martín-Peña et al., 2006). Here, we aimed to directly assess whether the synaptogenic effect of PI3K can be assigned to the pre- or postsynaptic side. To this end, we generated larvae in which PI3K was selectively overexpressed in the postsynaptic compartment by using a myosin heavy chain *Gal4* (*Mhc-Gal4*) driver (Schuster et al., 1996). We found that PI3K expressed postsynaptically did not elicit significant differences in the number of synapses compared to their sibling controls (Fig. 7C). Interestingly, the general morphology of the NMJ of *Mhc-Gal4* larvae (Fig. 7A) is remarkably similar to *Mhc-Gal4* PI3K-overexpressing larvae (Fig. 7B). This structural feature is radically different when it is compared with the increased branching observed when PI3K was driven presynaptically (e.g.

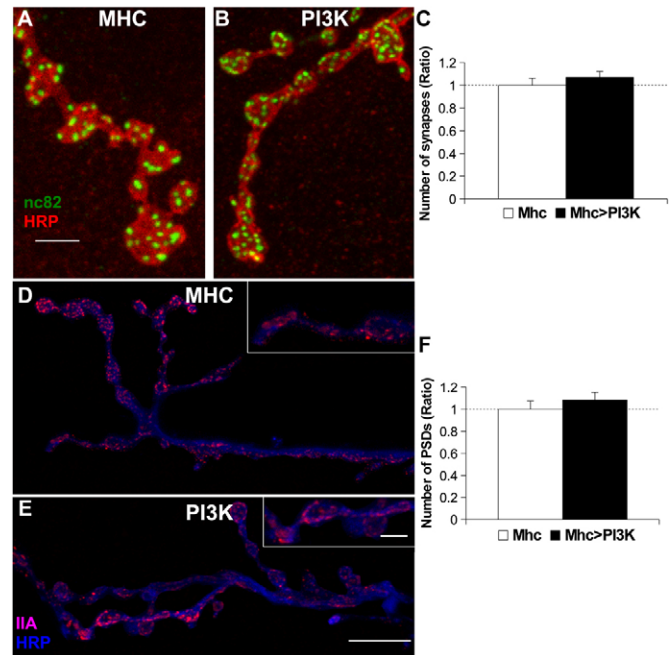


**Fig. 6. Selective temporal PI3K activation increases PSD number.** Representative confocal images of (A) *D42-Gal4* and (B) *D42-Gal4/UAS-PI3K* motor neurons immunolabelled for GluRIIA (red) and HRP (blue). Inserts in A and B are high magnification images of selected boutons. (C) Changes in PSD number during third instar larvae before and after PI3K activation. *D42-Gal4* and *D42-Gal4/UAS-PI3K* larvae carrying the temperature-dependent *Gal4* repressor *Gal80<sup>ts</sup>* were raised at 18°C until third instar larval stage and switched to 30°C at day 1 of LIII stage. Statistically significant differences were observed in PI3K-overexpressing larvae at 24 hours (*D42*: 458±35, *n*=9; *D42>PI3K*: 606±55, *n*=10) and 40h (*D42*: 637±35, *n*=8; *D42>PI3K*: 817±61, *n*=11). \**P*<0.05. Scale bars: 10 µm (A,B) and 3 µm (inserts in A,B).

*D42-Gal4/UAS-PI3K* larvae) (Martín-Peña et al., 2006). Furthermore, we analysed whether postsynaptic overexpression of PI3K affects PSD number using anti-GluRIIA and anti-HRP in both control (*Mhc-Gal4*) and PI3K larvae (*Mhc-Gal4/UAS-PI3K*) (Fig. 7D,E). No significant differences in the number of PSDs were found in PI3K larvae (747±48, *n*=8) with respect to their sibling controls (691±52, *n*=10) (Fig. 7F). Taken together, all these data indicate that the synaptogenic effect of PI3K inducing supernumerary, functional synapses, including PSDs increases, is attributable to its overexpression in the presynaptic compartment only.

## Discussion

As previously shown, the persistent high levels of PI3K activity are necessary not only for synapse formation, but also for its



**Fig. 7. Postsynaptically driven PI3K does not affect synapse number.** Confocal images of (A) a control *Mhc-Gal4* (B) a *Mhc-Gal4/UAS-PI3K* larva co-labelled with nc82 (green) and HRP (red) allowing both visualisation and quantification of synapses. (C) Overexpression of PI3K using a postsynaptic driver does not yield significant differences in synapse number compared with the control. Representative confocal sections of (D) a control *Mhc-Gal4* and (E) a *Mhc-Gal4/UAS-PI3K* larva co-labelled with GluRIIA (red) and HRP (blue). (F) PI3K driven postsynaptically does not produce significant differences in PSD number when compared with the control (ratio=1). Scale bars: 5 µm (A,B), 10 µm (D,E) and 3 µm (inserts in D,E).

subsequent maintenance and functionality (Cuesto et al., 2011; Martín-Peña et al., 2006). Unfortunately, however, the lack of a valuable PI3K antibody in *Drosophila* precludes an unequivocal detection of the protein in the pre- or postsynaptic compartments. Electrophysiological recordings from larval motor neurons overexpressing PI3K indicated an increase in evoked EPSP size and increments in both MEPP frequency and MEPP amplitude (Martín-Peña et al., 2006). These features could be accounted for by either a presynaptic or a postsynaptic role of PI3K. Additionally, rat hippocampal cultured neurons stimulated with PTD4-PI3KAc, a PI3K-activating transduction peptide, showed an increase in basal mEPSC frequency without any augmentation in mEPSC amplitude (Cuesto et al., 2011), consistent with an increase in functional synapses without changes in the postsynaptic receptor properties. Moreover, a postsynaptic role of PI3K has been demonstrated on the maintenance of the physiological PIP3 levels at postsynaptic densities, most likely by controlling AMPA receptor turnover (Arendt et al., 2010). Thus, to date, both immunochemical and electrophysiological findings failed to fully assign the synaptic compartment from which PI3K is causing these phenotypes.

The data reported here demonstrate that postsynaptic GluRIIs respond to PI3K changes induced in the presynaptic side of the developing NMJ. It has been previously reported that immature PSDs typically were dominated by GluRIIA, being subsequently balanced by GluRIIB incorporation during PSD and synapse



maturation (Schmid et al., 2008). This balance modifies the electrical properties of the glutamate receptor and seems to be directly correlated to increases of the presynaptic levels of Brp, crucial for mature presynaptic glutamate release (Schmid et al., 2008) and also for structural integrity of the active zone (Wagh et al., 2006). Thus, the integration of both pre- and postsynaptic elements controls efficiently the number of synapses and, hence, PSDs per NMJs (Reiff et al., 2002; Schmid et al., 2008; Sigrist et al., 2000; Sigrist et al., 2002). We have found here that presynaptic, but not postsynaptic, PI3K overexpression yields to an augmentation of all NMJ synaptic markers examined (Figs 1–3). By contrast, presynaptic PI3K downregulation does alter neither GluRIIA (Fig. 2) nor the two Dlg isoforms (Fig. 3) tested. However, the reduction of PI3K activity using PI3K<sup>DN</sup> gives rise to a decrease in both synapse and PSD (quantified by GluRIID immunostaining) numbers (supplementary material Figs S1, S4). This apparent discrepancy is probably due to the fact that the mechanism of attenuating PI3K activity with a dominant negative (PI3K<sup>DN</sup>) is not fully efficient to generate a detectable reduction in all GluRII subunits or Dlg protein levels.

Notably, here we have also found changes in the number of PSDs along larval development and NMJ maturation when PI3K overexpression is selectively restricted to third instar larvae (Fig. 6). Our data also indicate a timing of around 24 hours to generate increases in PSD number. However, we found no differences in synapse number at 24 hours, although there is a tendency towards increment in PI3K versus control larvae (Fig. 5). It is reasonable to assume that PI3K needs time to be transcribed, translated and accumulated in the NMJ to generate new synapses. Thus, the temperature shift, which allows PI3K expression only in the last 18 hours, is insufficient for the generation of fully mature synapses, detected by nc82 antibody, but enough to detect immature PSDs by GluRIIA immunostaining. Previous data have shown a synaptic half-life of around 24 h in larval NMJ (Rasse et al., 2005), but also in fully differentiated brain neurons (Martín-Peña et al., 2006). In mammals, dendritic spines are functional within a day after induction of long-term plasticity (LTP) in hippocampal slices (De Roo et al., 2008).

The dynamics of GluRIIA incorporation into PSDs is not affected by PI3K (Fig. 4). This feature could be explained by a PI3K role triggering the formation of additional new nascent synapses by increasing the number of sites where active zones will be formed, leaving unaffected the time of GluR incorporation at individual PSD. In turn, the number of PSDs could be incremented due to the recruitment of glutamate receptors from pools dispersed over the whole muscle cell membrane (Rasse et al., 2005) that could be able to respond to the PI3K-dependent increase of suitable synaptic sites. Previous findings obtained in excitatory synapses in vertebrates indicate that the PIP3 pathway is linked to AMPAR insertion in the membrane (Qin, Y. et al., 2005). In hippocampal neurons, PI3K localises and directly binds to the cytosolic C-terminus of the AMPAR (Man et al., 2003) and this PI3K-AMPA association plays a significant role in sustaining synaptic transmission (Arendt et al., 2010).

Different mechanisms could for the PI3K effects on postsynaptic proteins revealed in our study: first, a higher expression of glutamate receptor subunits should be achieved by increased synthesis or by reduced local receptor protein degradation. Indeed, the regulation of both protein synthesis

and turnover are key factors for synaptic terminal development and function at the *Drosophila* NMJ (van Roessel et al., 2004; Zalfa et al., 2006). Second, receptor subunits enter to the newly forming clusters from a diffuse pool of receptors, not by splitting from previously formed ones (Rasse et al., 2005). This indicates a crucial role for protein trafficking, diffusion and clustering mechanisms in the developing NMJ. In this context, SYD-2/Liprin- $\alpha$  has been implicated in both pre- and postsynaptic assembly by interacting with a multitude of synaptic proteins and by regulating synaptic cargo transport (Spangler and Hoogenraad, 2007) guiding transport of active zone components. Liprin family proteins steer transport in axons and dendrites (e.g. of AMPA receptors) to support synaptic specialisations and play a key role in AZ assembly function (Shin et al., 2003; Wagner et al., 2009; Wyszynski et al., 2002). Moreover, the presynaptic AZ-localised RhoGAP DSyd-1 acts in a trans-synaptic manner, by targeting DLiprin- $\alpha$  to maturing AZs, and also defining the amount and composition of glutamate receptors (GluRs) accumulating at PSDs (Owald et al., 2010).

The case of larval motor neurons studied here has a precedent on the optic ganglia in which presynaptic photoreceptors determine the number of synapses established with the lamina neurons (Canal et al., 1994). Here, the new data provide a molecular mechanism and highlight the instructive role of PI3K in the regulation of synapse number and postsynaptic proteins in the NMJ. Also, these data have paved the way to understand the trans-synaptic signals needed for the formation, maturation and dynamic regulation of the synapse.

## Materials and Methods

### Fly stocks

Fly line *D42-Gal4* was provided by Harold L. Atwood (University of Toronto, Canada) (Parkes et al., 1998); *OK6-Gal4* was from by Cahir J. O'Kane (University of Cambridge, United Kingdom) (Aberle et al., 2002); *elav-Gal4* was from Bloomington Stock Center (Lin and Goodman, 1994) and *Mhc-Gal4* line was a gift from Jean-François. Ferveur (Burgundy University, France) (Schuster et al., 1996). *UAS-PI3K* strain was provided by Juan Botas (Baylor College of Medicine, Houston, TX) (Leevers et al., 1996) and the *UAS-PI3K<sup>DN</sup>* line, carrying a dominant-negative PI3K mutation, was a gift from Sally Leever (Cancer Research Center, London) (Leevers et al., 1996). Both *UAS-GluRIIA<sup>RNAi</sup>* and *UAS-Dlg<sup>RNAi</sup>* lines were obtained from the Vienna Stock Center (Vienna, Austria; <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>). Line *Gal80<sup>ts</sup>* was a gift from Ronald Davis (The Scripps Research Institute, FL) (McGuire et al., 2003). The *GluRIIA<sup>RFP</sup>* and *GluRIIA<sup>GFP</sup>* constructs were provided by Stephan J. Sigrist (Institute of Biology of the FU Berlin and of the NeuroCure cluster of Excellence, Germany) (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). All crosses were reared at 25°C unless otherwise indicated.

### Immunohistochemistry

Third instar larvae were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde in PBT (PBS + 0.05% Triton X-100), except for anti-GluRIIA, for which larvae were fixed with 100% methanol at –20°C. Larvae were then washed briefly in 0.05% PBT, preincubated in blocking solution [95% PBT + 5% normal goat serum (NGS, Sigma)] for 30 minutes and incubated overnight at 4°C in blocking solution with the following primary antibodies: monoclonal antibody nc82 (1:10, DSHB, IA), anti-Brp (1:250, from Stephan J. Sigrist) to recognise Bruchpilot (Brp), an active zone protein at synapses. Whereas nc82 antibody recognises the C-terminal of Brp, the anti-Brp antibody is directed against a N-terminal peptide (Fouquet et al., 2009), anti-Dlg (1:250, DSHB) to label Discs Large, a postsynaptic protein homologous to the vertebrate DLG-MAGUK SAP97 protein (Thomas et al., 2010), anti-GluRIIA (1:100, DSHB), anti-GluRIIB (1:2000, from David Featherstone, UIC Biological Science, Chicago, IL), anti-GluRIIC (1:1000, from Aaron DiAntonio, Developmental Biology Department, University of Washington, WA), anti-GluRIID (1:500, from Stephan J. Sigrist) and anti-HRP (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories), which binds to the membrane of NMJ boutons. The following secondary antibodies were applied for 3 hours at room temperature: Alexa 488 (goat anti-mouse, 1:500, Molecular Probes), Alexa 568 (goat anti-rabbit, 1:500, Molecular Probes), Cy3 (goat anti-mouse, 1:500, Invitrogen) and Cy5-HRP (goat, 1:250, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Larvae were finally mounted in Vectashield (Vector Labs). Images from muscles

6-7 (segment A3) were acquired with a Leica Confocal Microscope TCS SP5 II (Mannheim, Germany). Serial optical sections at 1024×512 (100×50 µm) or 1024×1024 pixels (100×100 µm) were obtained at 0.5 µm with the 63× objective. At least eight larvae per genotype were analysed.

#### Fluorescent recovery after photobleaching experiments (FRAP)

Methodology and experiments were performed as previously published (Füger et al., 2007; Rasse et al., 2005). Briefly, we used a UAS line in which the GluRIIA subunit has been tagged with both RFP (GluRIIA<sup>mRFP</sup>, red fluorescent protein) and GFP (GluRIIA<sup>GFP</sup>, green fluorescent protein) markers in control (*OK6-Gal4*) and experimental larvae (*OK6-Gal4/UAS-PI3K*). Larvae were anaesthetised with Desflurane (Baxter) during image acquisition to avoid body wall movements. Serial optical sections (512×512 pixels) were taken at 0.5 µm with a 63× objective (50×50 µm) from NMJs of third instar larvae (muscles 26–27, segment A3) using a Leica Confocal Microscope TCS SP5 II (Mannheim, Germany). We considered three different points of analysis: before bleaching, 0 hours after bleaching and 14 hours after bleaching. Only the red channel (excited with a 561 nm diode-pumped solid-state laser) was bleached leaving the green channel (excited using the 488 nm ArKr laser line) unaffected as an internal reference. Following anaesthesia, larvae were placed in a plate containing agar, sugar and apple juice. 14 hours later, we took the last picture and observed the recovery of the GluRIIA<sup>mRFP</sup> signal. This recovery was measured as a difference (%) between the intensity value in the bleached area and the intensity value in the surrounding unbleached regions, allowing the quantification of the GluRII entry in the NMJ. Data are based on a minimum of seven larvae per genotype.

#### Temporal activation of Gal4 expression

Control (*D42-Gal4*) and experimental (*D42-Gal4/UAS-PI3K* and *D42-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>*) specimens were maintained after egg hatching at 18°C to keep *Gal80<sup>ts</sup>* repressor active, blocking *D42-Gal4* expression (McGuire et al., 2003). Third instar larvae were then shifted to 30°C, allowing Gal4 expression. After 24 and 40 hours of development, larvae were dissected and processed for immunostaining. On average, ten larvae per genotype were analysed.

#### Western blots

Fillets or brains of third instar larvae were collected, frozen at –80°C, and lysed in lysis buffer: 50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Switzerland), 1% Triton X-100 and phosphatase inhibitor cocktails 1 and 2 (Sigma-Aldrich). Membranes were then incubated with primary antibodies: anti-Dlg, 1:1250, and anti-GluRIIA, 1:1000 (Concentrate form, DSHB, Iowa), with 3% non-fat dry milk (Bio-Rad) in 0.05% PBST (PBS + Tween 20, Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. They were then washed with double distilled water twice and incubated with a secondary peroxidase-conjugated antibody goat anti-mouse IgG for 1.5 hours at room temperature. Membranes were finally washed with PBST (2×10 minutes) and revealed with SuperSignal (Thermo Scientific). Western blot bands were scanned and quantified using a GS800 densitometer and Quantity One software (Bio-Rad). The graphs in Figs 2,3 and Supplementary material Figs S2,S3 represent the average of five independent western blots experiments.

#### Quantification of Synapse and PSD numbers

ImageJ software (version 1.44, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) was used to determine the number of synapses and PSDs in immunostaining and FRAP experiments. PSDs (visualised with GluRIIs antibodies) were isolated and counted using the Analyze Particle tool (Rasse et al., 2005) and individual synapses (nc82 positive puncta) were quantified by using the Point Picker plug-in. A minimum of 10–12 larvae from each genotype was analysed.

#### Statistical analysis

All data are shown as mean ± s.e.m. Statistical significance was calculated using a Student's two-tailed *t*-test. The Kolmogorov-Smirnov test for normality was always performed before application of the Student's *t*-test for statistical significance. ANOVA test was used to compare absolute number of PSDs of all GluRII subunits in Fig. 1 and also to compare protein levels (western blots) in Figs 2,3. The software GraphPad Instat 3 was used throughout. Significant differences between compared groups was noted by \**P*<0.05, \*\**P*<0.005 and \*\*\**P*<0.0005.

#### Acknowledgements

We thank colleagues who kindly provided fly strains. We also thank the Bloomington and Vienna Stock Centers. We appreciate the critical comments of Alberto Ferrús, laboratory members and colleagues of the Cajal Institute and the technical help from the Sigrist lab to S.J.A.

#### Funding

Research was funded by grants from the Spain Ministry of Research [grant numbers BFU2006-10180; BFU2009-12410/BMC] to A.A.;

and a Research Fellowship [grant number BES-2007-16597] to S.J.A. This work was also supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft [grant numbers SFB 554 and EXC 257] to S.J.S. and W.F.

Supplementary material available online at

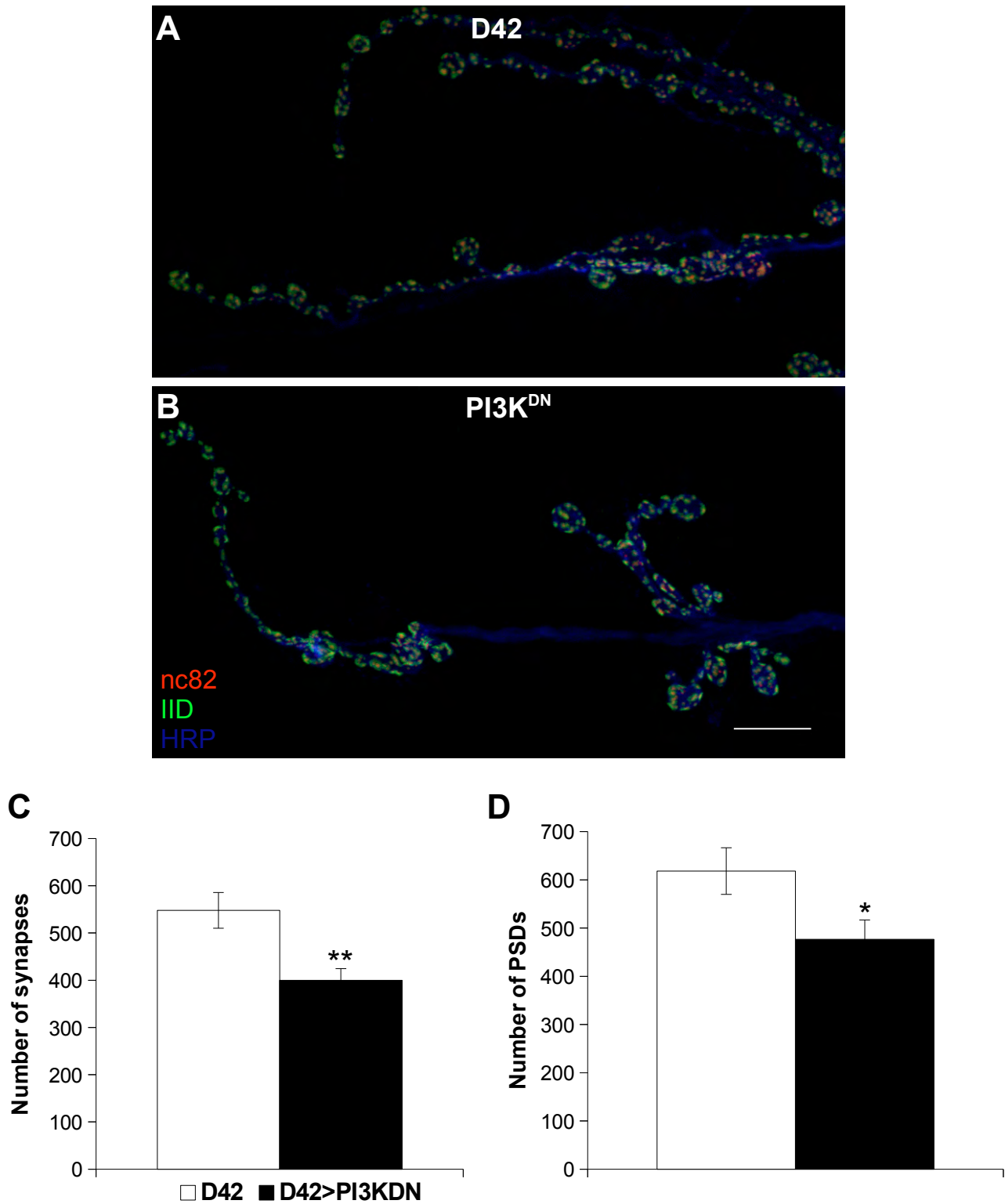
<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.102806/-DC1>

#### References

- Aberle, H., Haghghi, A. P., Fetter, R. D., McCabe, B. D., Magalhães, T. R. and Goodman, C. S. (2002). wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **33**, 545–558.
- Arendt, K. L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C. N., Martens, J. R. and Esteban, J. A. (2010). PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* **13**, 36–44.
- Canal, I., Fariñas, C. I., Gho, M. and Ferrús, A. (1994). The presynaptic cell determines the number of synapses in the *Drosophila* optic ganglia. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1423–1431.
- Collins, C. A. and DiAntonio, A. (2007). Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 35–42.
- Cuesto, G., Enriquez-Barreto, L., Caramés, C., Cantarero, M., Gasull, X., Sandi, C., Ferrús, A., Acebes, A. and Morales, M. (2011). Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **31**, 2721–2733.
- Chen, K. and Featherstone, D. E. (2005). Discs-large (DLG) is clustered by presynaptic innervation and regulates postsynaptic glutamate receptor subunit composition in *Drosophila*. *BMC Biol.* **3**, 1.
- De Roo, M., Klausner, P. and Muller, D. (2008). LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. *PLoS Biol.* **6**, e219.
- DiAntonio, A. (2006). Glutamate receptors at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Int. Rev. Neurobiol.* **75**, 165–179.
- DiAntonio, A., Petersen, S. A., Heckmann, M. and Goodman, C. S. (1999). Glutamate receptor expression regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **19**, 3023–3032.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51**, 7–61.
- Featherstone, D. E., Rushton, E., Rohrbough, J., Liebl, F., Karr, J., Sheng, Q., Rodesch, C. K. and Broadie, K. (2005). An essential *Drosophila* glutamate receptor subunit that functions in both central neuropil and neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **25**, 3199–3208.
- Fouquet, W., Oswald, D., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Dyba, M., Hallermann, S., Kittel, R. J., Eimer, S. and Sigrist, S. J. (2009). Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *J. Cell Biol.* **186**, 129–145.
- Franco, B., Bogdanik, L., Bobinac, Y., Debec, A., Bockaert, J., Parmentier, M. L. and Grau, Y. (2004). Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **24**, 6573–6577.
- Füger, P., Behrends, L. B., Mertel, S., Sigrist, S. J. and Rasse, T. M. (2007). Live imaging of synapse development and measuring protein dynamics using two-color fluorescence recovery after photo-bleaching at *Drosophila* synapses. *Nat. Protoc.* **2**, 3285–3298.
- Hoang, B. and Chiba, A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev. Biol.* **229**, 55–70.
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2700–2704.
- Leevers, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E. and Waterfield, M. D. (1996). The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J.* **15**, 6584–6594.
- Lin, D. M. and Goodman, C. S. (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**, 507–523.
- Man, H. Y., Wang, Q., Lu, W. Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T. P., Taghibiglou, C., Lu, J. et al. (2003). Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **38**, 611–624.
- Marrus, S. B., Portman, S. L., Allen, M. J., Moffat, K. G. and DiAntonio, A. (2004). Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **24**, 1406–1415.
- Martin-Peña, A., Acebes, A., Rodríguez, J. R., Sorribes, A., de Polavieja, G. G., Fernández-Fúnez, P. and Ferrús, A. (2006). Age-independent synaptogenesis by phosphoinositide 3 kinase. *J. Neurosci.* **26**, 10199–10208.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765–1768.
- Mendoza-Topaz, C., Urrea, F., Barria, R., Albornoz, V., Ugalde, D., Thomas, U., Gundelfinger, E. D., Delgado, R., Kukuljan, M., Sanxaridis, P. D. et al. (2008). DLGS97/SAP97 is developmentally upregulated and is required for complex adult behaviors and synapse morphology and function. *J. Neurosci.* **28**, 304–314.
- Montgomery, J. M., Zamorano, P. L. and Garner, C. C. (2004). MAGUKs in synapse assembly and function: an emerging view. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 911–929.
- Oswald, D. and Sigrist, S. J. (2009). Assembling the presynaptic active zone. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 311–318.

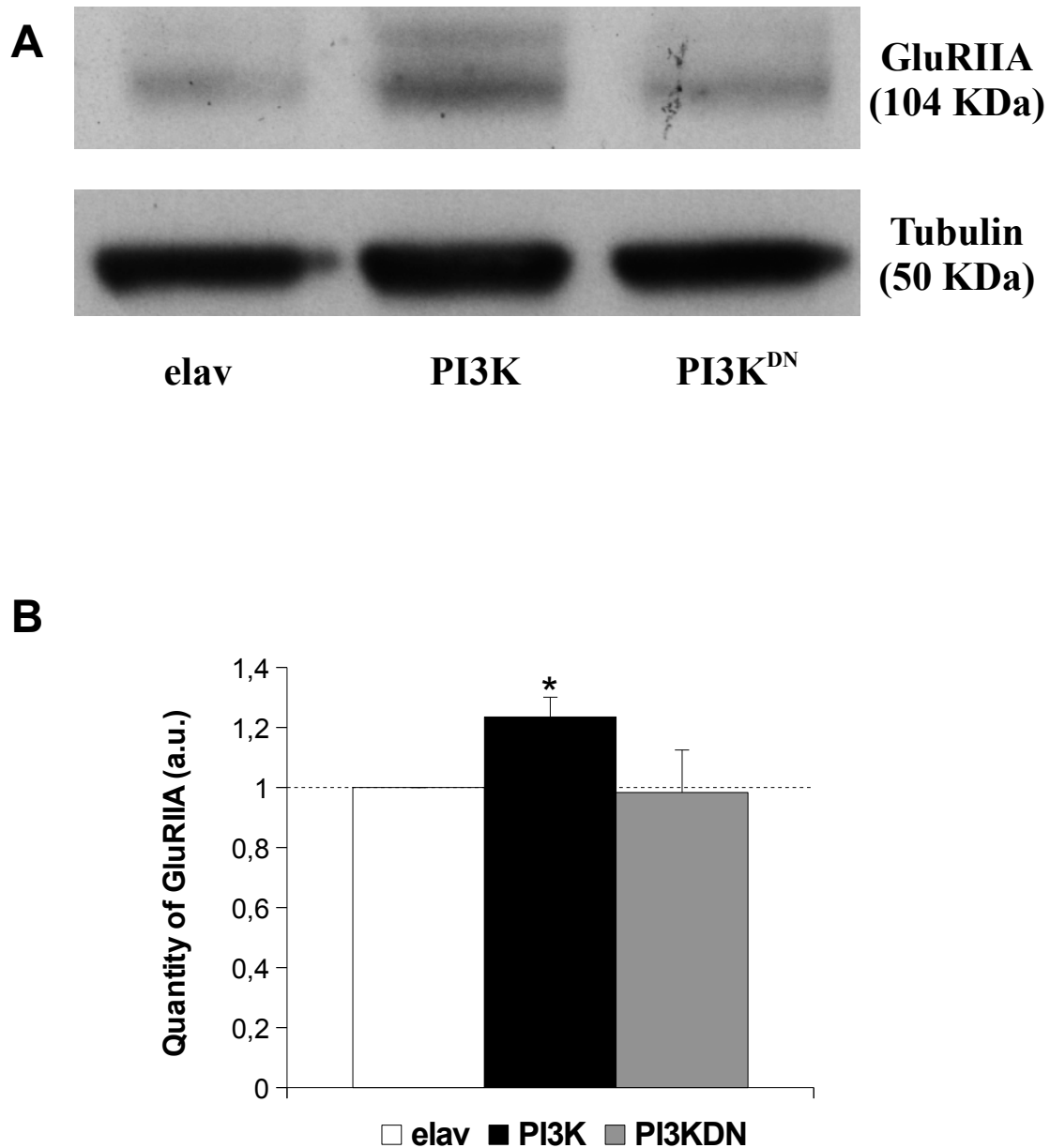
- Owald, D., Fouquet, W., Schmidt, M., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Christiansen, F., Zube, C., Quentin, C., Körner, J. et al. (2010). A Syd-1 homologue regulates pre- and postsynaptic maturation in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **188**, 565-579.
- Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P. and Boulianne, G. L. (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat. Genet.* **19**, 171-174.
- Parnas, D., Haghighi, A. P., Fetter, R. D., Kim, S. W. and Goodman, C. S. (2001). Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix. *Neuron* **32**, 415-424.
- Petersen, S. A., Fetter, R. D., Noordermeer, J. N., Goodman, C. S. and DiAntonio, A. (1997). Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila* reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron* **19**, 1237-1248.
- Qin, G., Schwarz, T., Kittel, R. J., Schmid, A., Rasse, T. M., Kappei, D., Ponimaskin, E., Heckmann, M. and Sigrist, S. J. (2005). Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **25**, 3209-3218.
- Qin, Y., Zhu, Y., Baumgart, J. P., Stornetta, R. L., Seidenman, K., Mack, V., van Aelst, L. and Zhu, J. J. (2005). State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes Dev.* **19**, 2000-2015.
- Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R. J., Mertel, S., Sigrist, C. B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G. et al. (2005). Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat. Neurosci.* **8**, 898-905.
- Reiff, D. F., Thiel, P. R. and Schuster, C. M. (2002). Differential regulation of active zone density during long-term strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* **22**, 9399-9409.
- Renner, M., Specht, C. G. and Triller, A. (2008). Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 532-540.
- Schmid, A., Hallermann, S., Kittel, R. J., Khorramshahi, O., Frölich, A. M., Quentin, C., Rasse, T. M., Mertel, S., Heckmann, M. and Sigrist, S. J. (2008). Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo. *Nat. Neurosci.* **11**, 659-666.
- Schuster, C. M., Ultsch, A., Schloss, P., Cox, J. A., Schmitt, B. and Betz, H. (1991). Molecular cloning of an invertebrate glutamate receptor subunit expressed in *Drosophila* muscle. *Science* **254**, 112-114.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S. (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* **17**, 641-654.
- Shin, H., Wyszynski, M., Huh, K. H., Valtchanoff, J. G., Lee, J. R., Ko, J., Streuli, M., Weinberg, R. J., Sheng, M. and Kim, E. (2003). Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha. *J. Biol. Chem.* **278**, 11393-11401.
- Sigrist, S. J., Thiel, P. R., Reiff, D. F., Lachance, P. E., Lasko, P. and Schuster, C. M. (2000). Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* **405**, 1062-1065.
- Sigrist, S. J., Thiel, P. R., Reiff, D. F. and Schuster, C. M. (2002). The postsynaptic glutamate receptor subunit DGluR-IIA mediates long-term plasticity in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **22**, 7362-7372.
- Siksou, L., Rostaing, P., Lechaire, J. P., Boudier, T., Ohtsuka, T., Fejtová, A., Kao, H. T., Greengard, P., Gundelfinger, E. D., Triller, A. et al. (2007). Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J. Neurosci.* **27**, 6868-6877.
- Spangler, S. A. and Hoogenraad, C. C. (2007). Liprin-alpha proteins: scaffold molecules for synapse maturation. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1278-1282.
- Thomas, U., Kobler, O. and Gundelfinger, E. D. (2010). The *Drosophila* larval neuromuscular junction as a model for scaffold complexes at glutamatergic synapses: benefits and limitations. *J. Neurogenet.* **24**, 109-119.
- van Roessel, P., Elliott, D. A., Robinson, I. M., Prokop, A. and Brand, A. H. (2004). Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase-promoting complex. *Cell* **119**, 707-718.
- Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Dürrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M. C., Schmidt, M., Qin, G. et al. (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* **49**, 833-844.
- Wagner, O. I., Esposito, A., Köhler, B., Chen, C. W., Shen, C. P., Wu, G. H., Butkevich, E., Mandalapu, S., Wenzel, D., Wouters, F. S. et al. (2009). Synaptic scaffolding protein SYD-2 clusters and activates kinesin-3 UNC-104 in *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 19605-19610.
- Wyszynski, M., Kim, E., Dunah, A. W., Passafaro, M., Valtchanoff, J. G., Serra-Pagès, C., Streuli, M., Weinberg, R. J. and Sheng, M. (2002). Interaction between GRIP and liprin-alpha/SYD2 is required for AMPA receptor targeting. *Neuron* **34**, 39-52.
- Zalfa, F., Achsel, T. and Bagni, C. (2006). mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 265-269.
- Ziff, E. B. (1997). Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* **19**, 1163-1174.



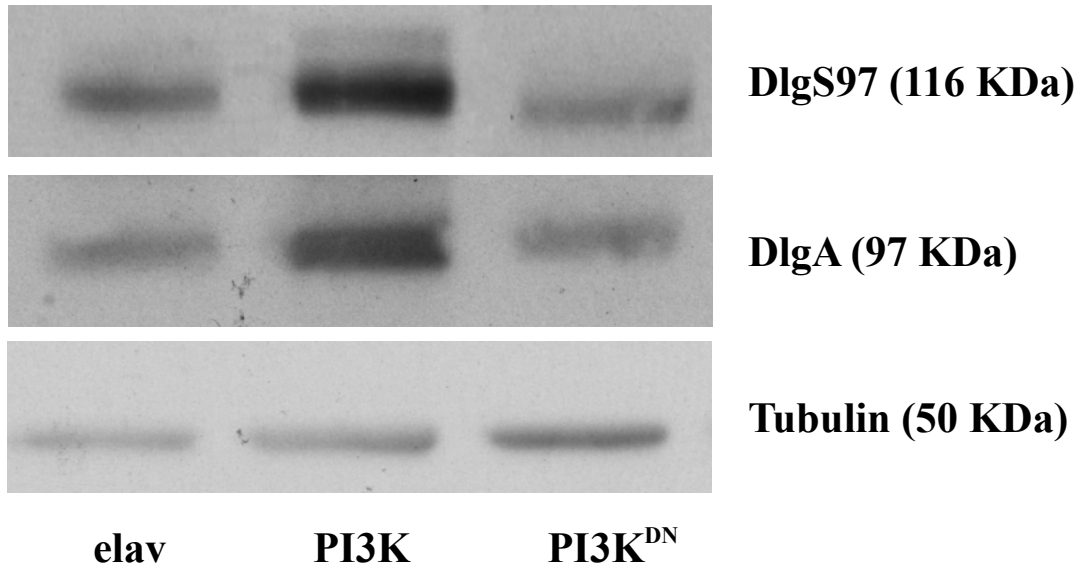
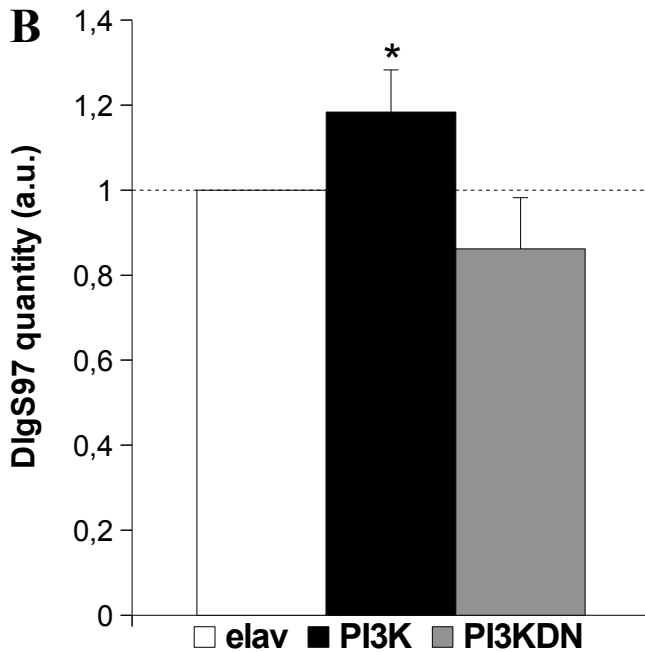
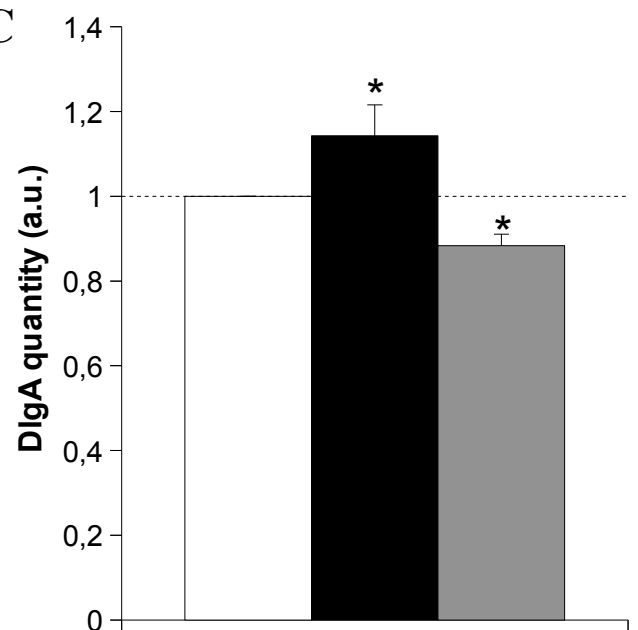


**Fig. S1. Effect of presynaptic PI3K<sup>DN</sup> overexpression on GluRII expression.** Representative Z-projection confocal images showing triple immunostainings against  $\alpha$ -nc82 (red), GluRIID (green) and  $\alpha$ -HRP (blue) to visualize and quantify synapses and PSDs in **A**) control *D42-Gal4* (n=9) and **B**) *D42-GAL/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* (n=9) RP3 larval motor neurons innervating muscles fibres 6/7. **C**) Histogram showing the absolute number of synapses in control and experimental genotypes. Note the significant decrease (close to 27%) in synapse number observed in the larvae expressing the PI3K<sup>DN</sup> construct. \*\* $P < 0.005$ . **D**) Histogram showing the absolute number of PSDs counted after immunostaining against GluRIID subunit in *D42-Gal4* (n=9) and *D42-GAL/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* (n=10) larvae. There is a significant PSDs number decrement of 23% in the PI3K<sup>DN</sup> expressing larvae. \*\* $P < 0.005$  and \* $P < 0.05$  Scale bar shown in **B**), 10  $\mu$ m.

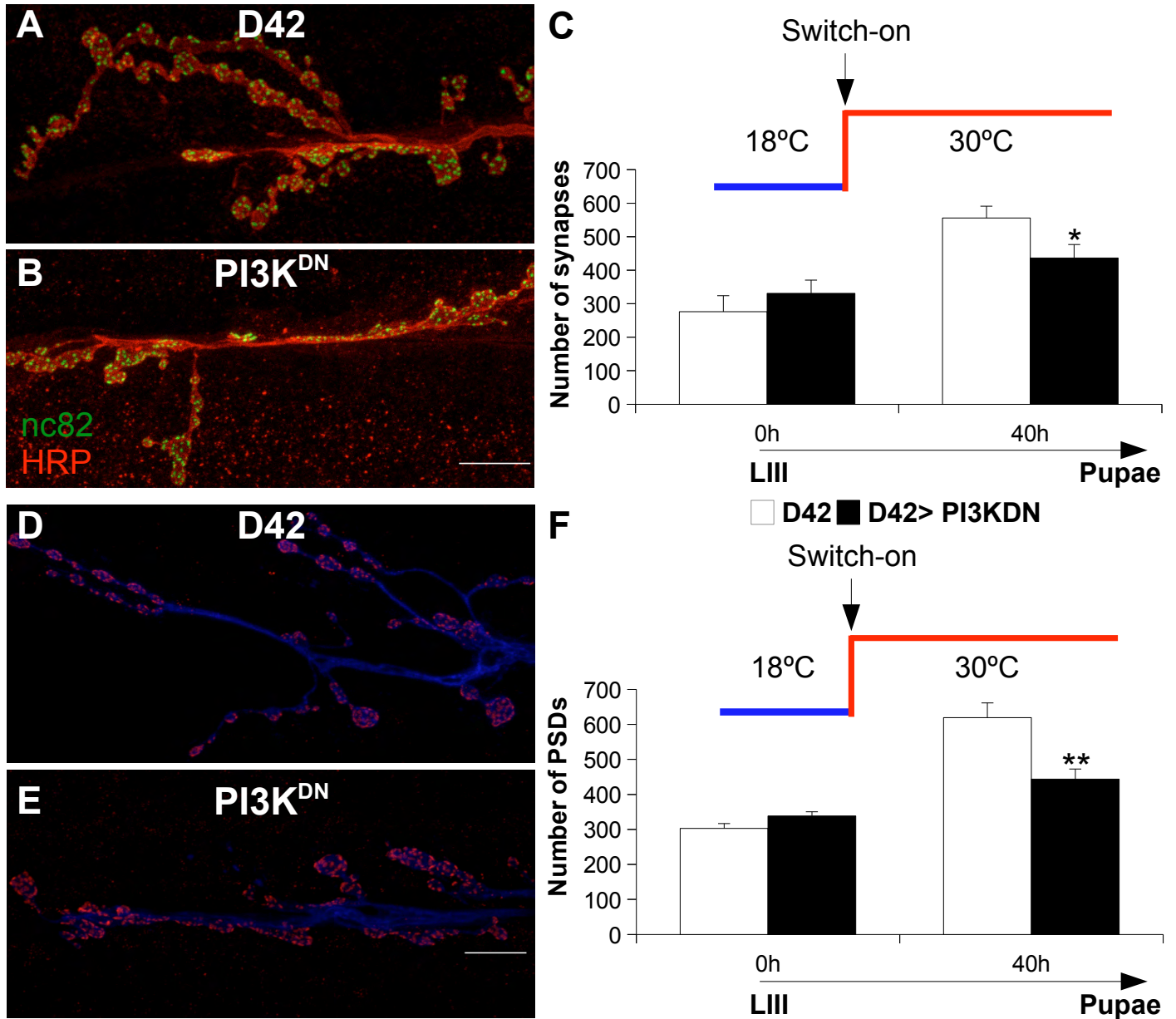




**Fig. S2. PI3K-dependent regulation of GluRIIA levels in larval brains.** **A)** Representative immunoblot indicating GluRIIA levels in *elav-Gal4* control, *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* larval brains. This GluRIIA antibody recognizes two bands which a lower band corresponding to an estimated molecular weight of 104 kDa. The upper band could be due to posttranslational modifications. **B)** Summary graph showing GluRIIA levels quantified and normalized versus Tubulin in each genotype. Note the increase of 24% in the level of GluRIIA in PI3K overexpressing larval brains. No differences were observed when PI3K<sup>DN</sup> is upregulated in larval brains (n=11 larval brains per genotype, n=3 independent Western Blots). a.u.: arbitrary units. \**P*<0.05.

**A****B****C**

**Fig. S3. Effect of PI3K and PI3K<sup>DN</sup> overexpression on Dlg levels in larval brains.** **A)** Representative Western blot showing Dlg protein levels in control *elav-Gal4*, *elav-Gal4/UAS-PI3K* and *elav-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* larval brains. The Dlg antibody recognizes two isoforms of the protein: DlgS97 (116 kDa) and DlgA (97 kDa). **B)** Histogram showing the quantification of DlgS97 for the three genotypes. Note that DlgS97 exhibit increased levels only when PI3K is overexpressed. **C)** Graph of DlgA levels for the same genotypes. DlgA levels significantly increase when PI3K is overexpressed and decrease when it is downregulated by using PI3K<sup>DN</sup>. The quantity of both Dlg isoforms in each genotype was always normalized versus Tubulin (n=11 larval brains per lane, n=5 independent Western Blots). \**P*<0.05



**Fig. S4. Selective temporal PI3K downregulation decreases synapse number.** Panels show representative confocal sections of **A)** *D42-Gal4* and **B)** *D42-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* motor neurons immunolabelled against nc82 (green) and  $\alpha$ -HRP (red). **C)** Graph represents the changes in synapse number during third instar larvae before and after activation of a dominant negative form of PI3K (PI3K<sup>DN</sup>). *D42-Gal4* and *D42-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* larvae carrying the temperature dependent *Gal4* repressor *Gal80<sup>ts</sup>* were raised at 18°C until third instar larvae. At this temperature, *Gal4* expression is abolished. Temperature was then switched to 30°C at day 1 of LIII stage. At this temperature, *Gal80<sup>ts</sup>* repressor is inhibited, allowing *Gal4* and also PI3K expression along third instar larval development. Statistically significant differences were observed in PI3K<sup>DN</sup> larvae (n=10, 437±40) only at 40h after *Gal4* activation compared to control (n=11, 542±35) larvae. LIII= 3<sup>rd</sup> instar larvae. Confocal sections from **D)** *D42-Gal4* and **E)** *D42-Gal4/UAS-PI3K<sup>DN</sup>* larvae labelled against GluRIIA (red) and  $\alpha$ -HRP antibodies (blue). **F)** Histogram showing the changes in PSDs number previous to and 40h after PI3K<sup>DN</sup> overexpression. Data show a decrease in the number of PSDs in PI3K<sup>DN</sup> (444±29, n=5) versus control (619±42, n=5) larvae only at 40h. \**P*<0.05 and \*\**P*<0.005. Scale bar: **A–D)**, 10  $\mu$ m.